



UNIVERSIDAD DE CANTABRIA
FACULTAD DE MEDICINA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO DE FIN DE GRADO

**Interacciones entre las vías de señalización
de la melatonina y los miRNAs**

**Interactions between melatonin signaling
pathways and miRNAs**

Autor: Pablo García Velardo

Director: Carlos Martínez Campa

Santander, Junio 2019

ÍNDICE

Resumen	4
Abstract.....	4
Objetivos.....	6
Metodología	6
Melatonina.....	7
Introducción.....	7
Anatomía de la glándula pineal	7
Síntesis, secreción y transporte	7
Regulación de la síntesis	9
Metabolismo.....	10
Mecanismos de acción de la melatonina.....	10
Funciones de la melatonina.	12
Mecanismo de acción antitumorales.....	16
Los microRNAs	23
Biogénesis de los miRNAs	23
Mecanismos de silenciamiento y regulación de los miRNAs	25
Papeles biológicos de los miRNAs.....	26
Papel de los miRNAs en diversas enfermedades.	27
Papel de los miRNAs en el cáncer	29
Perspectivas futuras	34
Melatonina y miRNAs.....	35
Melatonina, miRNAs y cáncer	39
Bibliografía.....	41

Resumen

La melatonina es una hormona producida en la glándula pineal cuya función principal es la de actuar como sincronizador de los ritmos circadianos, tomando como base de la regulación la presencia/ausencia de luz ambiental. Durante las últimas décadas se han ido caracterizando otras muchas acciones entre las que se incluyen funciones protectoras en cerebro, hueso y sistema cardiovascular, la inmunomodulación y función antioxidante. Además, esta indolamina ejerce una acción antitumoral en diferentes tipos de cáncer mediante varios mecanismos de acción entre los que destacan la ralentización del ciclo celular, efectos anti-proliferativos, estimuladores de la apoptosis, inhibidores de metástasis y estimuladores de la sensibilidad a quimioterapia.

Algunas de las dianas moleculares de la melatonina son pequeñas moléculas de ribonucleótidos: los miRNAs, una clase de RNAs no codificantes capaces de regular la expresión génica, con una longitud de entre 19 y 25 nucleótidos que se unen al RNAm promoviendo su degradación o inhibiéndolo. Estas pequeñas moléculas participan en diversas situaciones patológicas como la aterosclerosis, la diabetes o la caquexia. También juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión tumoral, existiendo miRNAs oncogénicos y miRNAs que actúan como supresores de tumores. Las perspectivas futuras de los miRNAs son prometedoras, ya que se está empezando a considerar su utilidad tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

En la última parte de este trabajo hemos revisado aquellos artículos de la literatura científica que establecen una relación entre las dos entidades previamente mencionadas. En diferentes estudios (la mayor parte publicados desde 2016 hasta la fecha) se describe la interacción de melatonina y miRNAs determinados en diferentes enfermedades como la fibrosis hepática, el autismo y el cáncer. La progresión exponencial en el número de artículos referentes a este tema en estos últimos 3-4 años hace pensar en una ampliación importante del conocimiento de la regulación de los miRNAs por parte de la melatonina en años venideros.

Abstract

Melatonin is a hormone produced in the pineal gland which main function is to act as a synchronizer of circadian rhythms, depending its regulation on the presence or absence of environmental light. During last decades, many other actions of melatonin have been characterized, including protective functions in brain, bone, cardiovascular system, immunomodulation and antioxidant function. In addition, this indolamine exerts an antitumor action in different types of cancer through several mechanisms of action, among them we can mention cell cycle arrest, anti-proliferative effects, stimulation of apoptosis, inhibition of migration, invasion, angiogenesis, metastasis and stimulation of the sensitivity to chemotherapeutic agents.

Some of the molecular targets of melatonin are small molecules of ribonucleotides: miRNAs, a class of non-coding RNAs capable of regulating gene expression, with a length

of between 19 and 25 nucleotides that bind to mRNAs promoting its degradation or inhibiting translation. These small molecules participate in different pathological situations such as atherosclerosis, diabetes or cachexia. Another fundamental role, mediated by oncogenic miRNAs and miRNAs that act as tumor suppressors, is their effect on tumor development and progression. The future perspectives of miRNAs are promising, since their usefulness in the diagnosis and treatment of different types of cancer is currently under consideration.

In the last part of this work, we have reviewed those articles from the scientific literature that establish a relationship between the two entities previously mentioned (melatonin and miRNAs). In different studies (most published since 2016) the interaction of melatonin and miRNAs in different diseases such as hepatic fibrosis, autism and cancer is described. The exponential progression in the number of articles referring to this topic in the last 3-4 years suggests an important extension of the knowledge of the regulation of miRNAs by melatonin in years to come.

Objetivos

- El objetivo fundamental de este trabajo ha sido recopilar la información disponible acerca de la relación entre la melatonina los miRNAs y diferentes estados fisiológicos y patológicos, centrándonos de forma importante en cáncer.
- Para ello hemos llevado a cabo una revisión de la literatura publicada hasta hoy día con el objetivo de definir de forma genérica tanto a la melatonina como a los miRNAs, haciendo especial hincapié en sus acciones antitumorales.
- Por último, se establecen perspectivas futuras de estas dos moléculas de forma combinada y por separado tanto en el diagnóstico como en el tratamiento de diversas entidades patológicas.

Metodología

Para el desarrollo del trabajo hemos realizado una revisión bibliográfica del tema, utilizando diversas bases de datos (principalmente PubMed), seleccionando artículos publicados en revistas científicas de alto impacto (como son por ejemplo Cancer Research, Journal of Pineal Research, Journal of Neuroendocrinology) así como libros y fuentes de soporte digital.

En la búsqueda de bibliografía se han empleado las siguientes palabras clave: melatonina, miRNAs, cáncer, metástasis, apoptosis, cáncer de mama, metabolismo.

Melatonina

Introducción

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una hormona amínica producida principalmente por los pinealocitos de la glándula pineal, aunque su síntesis la podemos encontrar en multitud de tejidos, como la retina, la médula ósea o el tracto gastrointestinal. La glándula pineal es una estructura anatómica conocida desde la antigüedad. Las primeras descripciones anatómicas de la epífisis se remontan al siglo II a.C cuando Herófilo de Calcedonia la vinculó a la regulación del “flujo del pensamiento”. Su nombre se lo debe a Galeno que describió su anatomía y le otorgó el nombre de *Koranium* que significa piña que es la forma que adopta esta glándula en los seres humanos.

En 1958 Aaron Lerner y varios colegas de la Universidad de, en su búsqueda de sustancias que pudieran ser eficaces en el tratamiento del vitíligo o la hiperpigmentación, describieron por primera vez el aislamiento de melatonina a partir de glándulas pineales bovinas Yale (Lerner et al. 1958). Muy pronto descubrieron, en estudios de laboratorio con animales, que la melatonina era capaz de ejercer sus acciones en el cerebro, las gónadas y otros componentes del sistema neuroendocrino (Wurtman et al. 1963; Wurtman et al. 1968; Reiter RJ et al. 1978).

Anatomía de la glándula pineal

Embriológicamente, la epífisis es una estructura encefálica que deriva de la porción caudal del diéncéfalo dorsal, que más tarde conformará el hipotálamo. Se desarrolla en el segundo mes de vida intrauterina como una evaginación del techo del diéncéfalo. En el adulto tiene una longitud de unos 8 mm y pesa unos 100-200mg y se sitúa sobre el surco que separa los colículos superiores con la pared posterior del tercer ventrículo por debajo del esplenio del cuerpo calloso, del que está separado por la tela coroidea y la gran vena central (García-Porrero et al. 2005). Se encuentra unida a las comisuras habenuar y posterior por el tallo pineal (Roa y Del Sol, 2004). Histológicamente, se constituye por pinealocitos en un 80% y por elementos vasculares, nerviosos y células de la glía (Cardinali et al, 1994; Dun-Xian T et al, 2015).

La innervación de la glándula la realizan fibras simpáticas que se originan en el sistema nervioso central. La principal aferencia postganglionar está constituida por fibras periarteriales que proceden del ganglio cervical superior. La innervación parasimpática es escasa. Además, se encuentra innervación de tipo peptidérgico que se ve involucrada en la regulación de la secreción por parte de la glándula.

Síntesis, secreción y transporte

La mayoría de los estudios relacionados con la síntesis de la melatonina se han realizados en vertebrados, en particular en mamíferos. En estos animales, el precursor inicial de la síntesis es el triptófano, aminoácido esencial que es captado de la circulación sistémica. La vía clásica de síntesis de la melatonina es la que se muestra en la Figura 1.

Sitio y patrón de secreción de melatonina

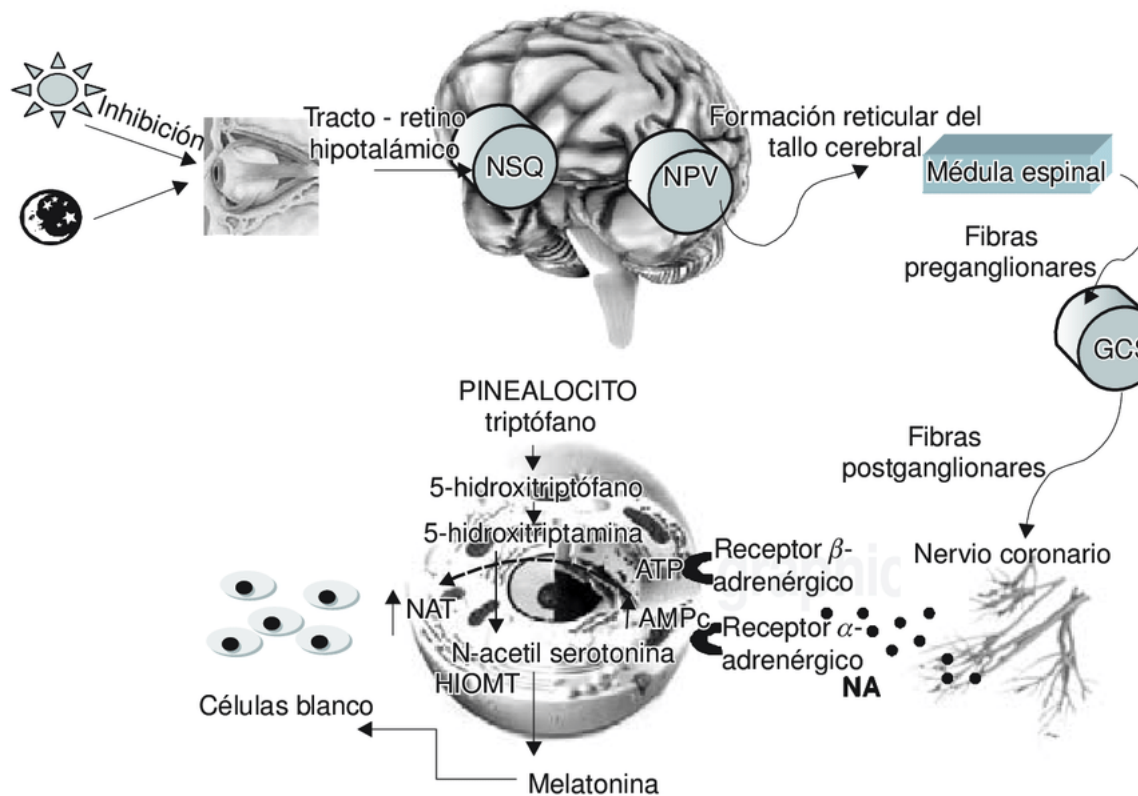


Figura 1. Síntesis de melatonina a partir de triptófano y serotonina. Tomado de Reyes-Prieto et al. (2019).

En esta vía, el enzima limitante que controla la cantidad de melatonina producida es la N-acetiltransferasa (SNAT). Este hecho está basado en la observación de la actividad de SNAT donde se puede apreciar un claro ritmo circadiano que coincide con las oscilaciones de los niveles de melatonina circulantes. El resto de enzimas participantes en la síntesis parecen poseer ritmo circadiano. La SNAT se encarga de acetilar la 5-hidroxitriptamina para obtener N-acetilserotonina empleando el Co-A como donador del grupo acilo. La melatonina difunde hacia la circulación sistémica y cerebral por un mecanismo de difusión simple una vez que es sintetizada. Va a ir transportada unida principalmente a la albúmina, en un 70%, mientras que el porcentaje restante circula de manera libre.

Además de en la glándula pineal también encontramos síntesis de melatonina en la retina, el tracto gastrointestinal, la piel y la médula ósea, aunque su función será diferente a la que realiza la sintetizada por la glándula pineal, y la ejercerá a nivel local como antioxidante (Acuña-Castroviejo et al. 2014).

Regulación de la síntesis

La síntesis y secreción de la melatonina está estimulada por la oscuridad e inhibida por la luz (Figura 1). La información luminosa se transmite desde la retina a la glándula pineal a través de los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo. La secuencia es la siguiente: los fotorreceptores de la retina generan y transmiten durante la oscuridad potenciales de acción al núcleo supraquiasmático a través del tracto retinohipotalámico. El núcleo supraquiasmático actúa como el encargado de regular los ritmos circadianos, por lo tanto, cuando recibe los potenciales de acción procedentes de la retina desencadena una vía de señalización que activa al ganglio cervical superior para que éste produzca noradrenalina a través de las neuronas postganglionares. El último paso se produce en la glándula pineal, que capta la noradrenalina a través de sus receptores adrenérgicos (alfa y beta) los cuales activan una cascada de señalización intracelular (Cardinali DP et al. 1994; Vilella D et al. 2013).

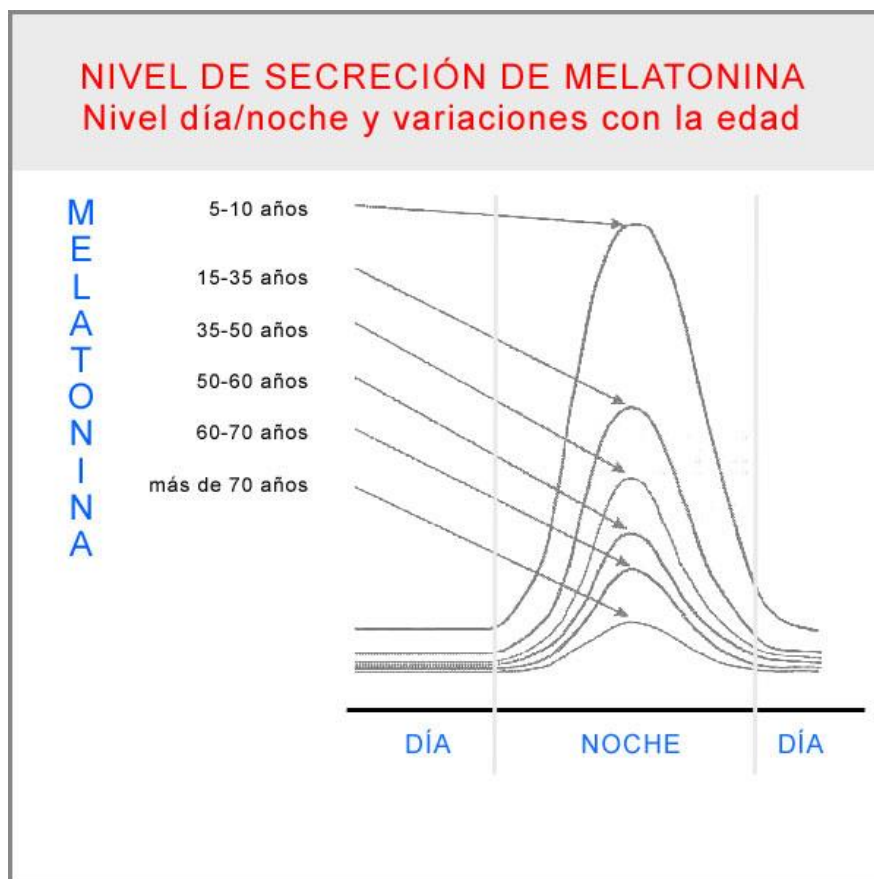


Figura 2. Secreción de melatonina en humanos.

En humanos, su secreción empieza después de la puesta de sol, alcanzando su pico máximo en la mitad de la noche (entre las 2 y las 4 am) y disminuye gradualmente en la segunda parte de la misma. Cerca del 80% de la melatonina es sintetizada de noche, con concentraciones séricas que varían entre 80 y 120 pg/mL. Durante las horas de luz, las concentraciones séricas son más bajas, aproximadamente entre 10-20 pg/mL (Figura 2). Las concentraciones varían de forma considerable con la edad, en los niños menores de 3 meses se encuentran niveles muy bajos. La secreción de melatonina aumenta conforme avanza la edad, se ha reportado una asociación entre la secreción de la melatonina y organización ritmo sueño-vigilia a partir de los 6 meses de edad (Sadeh A,

1997). Sin embargo, estudios más recientes sugieren que el ritmo de la melatonina se alcanza alrededor de los 3 meses de edad en un desarrollo normal (Joseph D et al. 2014). A partir de los 3 años se observa una estabilización en los ritmos de secreción de la melatonina. Los niveles máximos se alcanzan entre los 4 y los 7 años, a partir de los cuales comienza a disminuir (Tordjman S et al. 2017).

Metabolismo

Durante décadas, la 6-hidroximelatonina se ha considerado el único metabolito de la melatonina. Actualmente, se sabe que el metabolismo de la melatonina es un proceso complejo y que la 6-hidroximelatonina es únicamente uno entre muchos metabolitos.

La melatonina se elimina a través de un proceso enzimático, pseudoenzimático o mediante su interacción con especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (NOS) (Acuña-Castroviejo D et al. 2014). Fundamentalmente su metabolización va a ser llevada a cabo a varios niveles (Figura 3):

- Hepático, constituye el 95%, aquí se lleva a cabo la producción de 6-hidroximelatonina, que posteriormente se conjugará con sulfato o glucurónido para que se elimine por la orina (Venegas-Maldonado, 2013).
- Cerebral y otros tejidos periféricos como retina y piel, aquí se realiza el 5% del metabolismo, mediante dos vías:
 - ✓ Vía indólica: 5-metoxindolacético o 5-metoxitriptofol
 - ✓ Vía kinúrica: producción de AFMK y AMK, que son metabolitos activos. Éstos tienen acción antioxidante.

Mecanismos de acción de la melatonina

La melatonina va a ejercer sus efectos a través de la interacción con sus receptores (tanto de membrana como nucleares), a través de proteínas citosólicas o por interacción indirecta.

- A través de receptores de membrana, donde encontramos tres receptores diferentes. Los receptores Mel-1, que se encuentran fundamentalmente en el núcleo supraquiasmático, el hipotálamo basal, otras regiones del SNC y en la vasculatura de ciertos órganos y en células del sistema inmune, controlan la movilización del Ca^{2+} a través de proteínas G, al igual que los Mel-2 aunque estos actúan fundamentalmente a nivel de la retina (Dollins et al. 1993). Los Mel-3 que se encuentran localizados en glándula pineal y riñón parecen ser una forma de quinona reductasa.

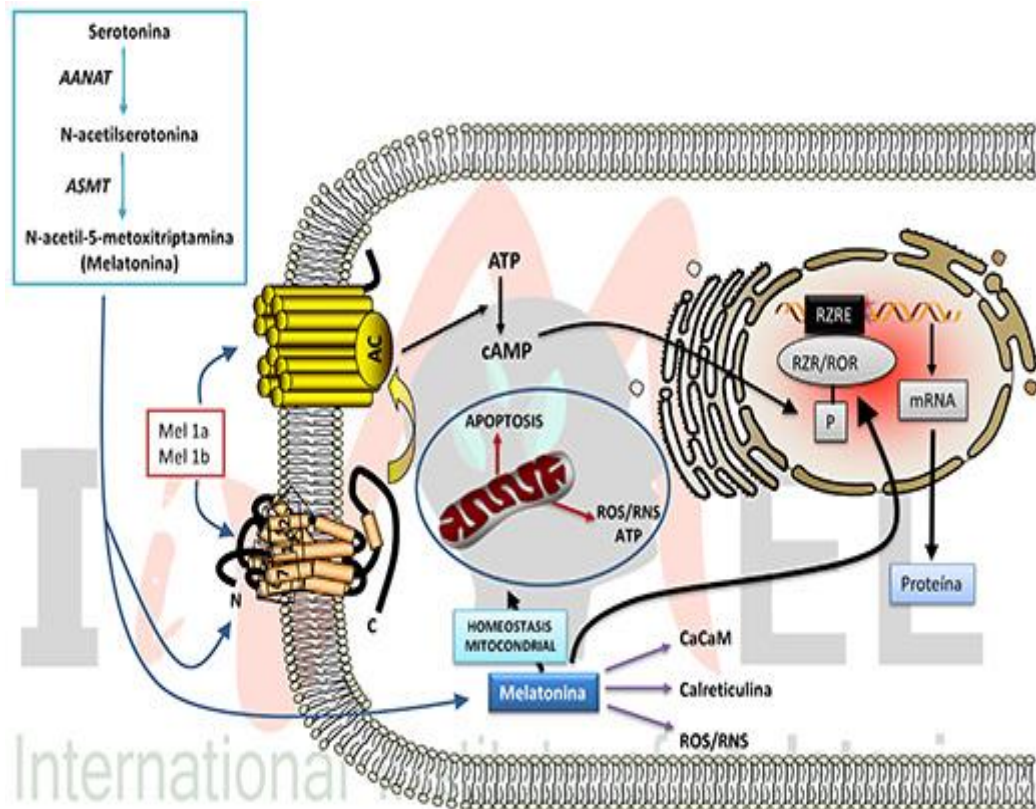


Figura 3. Mecanismos generales de acción de la melatonina (Tomado de Instituto Internacional de la Melatonina).

- La melatonina, gracias a su naturaleza lipofílica, también ejerce su acción mediante la unión a receptores nucleares (ROR) que funcionan como factores de transcripción intranucleares. Encontramos tres tipos diferentes: alfa, beta y gamma. Estos receptores nucleares parece que podrían estar involucrados en funciones de inmunomodulación a través de la 5-lipooxigenasa (Venegas-Maldonado, 2012).
- Otro mecanismo de acción de la melatonina se produce mediante su unión a proteínas del citosol. En particular, la interacción con la calmodulina juega un papel en la regulación del citoesqueleto celular, además también se ha asociado esta interacción con el efecto antiexcitador de la indolamina, debido a que esta unión impide que el óxido nítrico estimule la liberación de glutamato, un neurotransmisor excitador. Por ello, se propone que la melatonina puede tener una función como anticonvulsivante (Castroviejo y cols, 1994). Además, su unión con la calreticulina se asocia a la regulación de diferentes hormonas en el núcleo celular (Macias et al. 2003).
- Por último, la melatonina ejerce funciones directas sobre la mitocondria. En esta organela ejerce un efecto antioxidante directo, provocando un aumento de los niveles de GSH, disminuyendo el consumo de oxígeno en la mitocondria y aumentando la actividad de los complejos respiratorios con el consiguiente aumento de ATP (Leon et al. 2004).

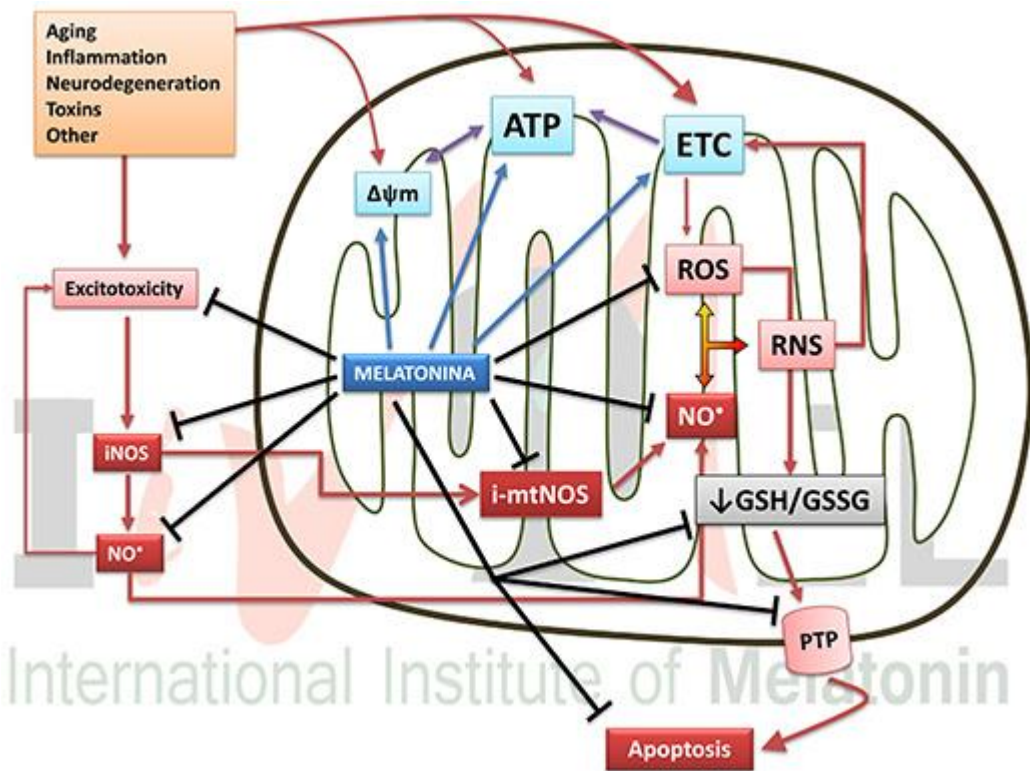


Figura 4. Resumen de las principales vías de señalización moduladas por la melatonina (Tomado de Instituto Internacional de la Melatonina).

Funciones de la melatonina.

Regulación de ritmos biológicos

El ser humano tiene la necesidad de adaptarse a diferentes cambios geofísicos y responder de una forma óptima a ellos (Ángeles-Castellanos et al. 2007). Uno de los más importantes es la alternancia entre luz/oscuridad que se genera por la rotación de la Tierra, ésta es la manera en la que se organizan las actividades diarias humanas e incluyen una multitud de variables fisiológicas y patológicas (Waterhouse, DeCoursey, 2004). Esta organización depende de la información que recibe nuestro organismo del exterior y también de la generada por el sistema circadiano, que es endógeno. Este sistema circadiano es inherente a los seres vivos, ya que incluso en condiciones de aislamiento externo se sigue expresando y le proporciona al organismo un orden temporal (Magri et al. 1997).

La regulación de estos ritmos circadianos está asociada a una estructura anatómica: los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo, localizados a ambos lados del tercer ventrículo. Su manipulación o destrucción produce la alteración de prácticamente todos los ritmos circadianos, como por ejemplo, la regulación de la temperatura, la ingestión de alimentos y la conducta sexual, entre otros muchos (Mena-Barreto, Colin, 2007). En la especie humana, una de las principales funciones de la melatonina es participar activamente en la coordinación del ciclo sueño-vigilia. El incremento vespertino en la secreción de melatonina se encuentra asociado con el desencadenamiento del sueño. Esta observación ha quedado demostrada mediante el estudio del jet-lag, fenómeno en

el cual se desincronizan los ritmos biológicos, fundamentalmente el de sueño-vigilia. Ha quedado demostrado que la administración de melatonina acelera la resincronización del reloj circadiano reduciendo los síntomas típicos del jet lag, como serían el insomnio, la irritabilidad o las molestias gastrointestinales (Mediavilla et al, 2010).

Inmunomodulación

Antes del descubrimiento de la melatonina, en 1926, Berman ya había observado un aumento en la resistencia a enfermedades infecciosas en gatos alimentados durante dos años con extractos de glándulas pineales provenientes de toros. Así se estableció la primera relación entre la melatonina y su función inmunomoduladora (Carrillo-Vico et al. 2013). Un amplio número de evidencias han demostrado una clara relación entre el sistema neuroendocrino e inmune, los cuales se comunican de manera bidireccional. Esta comunicación se llevaría a cabo mediante sustancias sintetizadas en ambos sistemas como la acetilcolina, ACTh, endorfinas, somatostatinas o la melatonina (Blalock JE y Smith EM, 2007).

La melatonina va a actuar tanto en la inmunidad innata como en la adquirida. Su acción sobre la inmunidad innata tiene lugar mediante la estimulación de la producción de células progenitoras de granulocitos y macrófagos; además posee acción estimulante sobre la hemopoyesis (Maestroni y Conti, 1996). Los monocitos y macrófagos poseen receptores para la melatonina que cuando ésta interacciona con ellos estimula su producción (García-Maurino y cols, 2000). Estos efectos sobre la inmunidad no específica de la melatonina nos sugieren que el tratamiento con ella puede favorecer la destrucción del agente infeccioso o ayudar a detener el crecimiento neoplásico. Además, ha quedado demostrado que la melatonina también ejerce su función en el último componente de la inmunidad innata, las células NK, las cuales, mediante la administración exógena de melatonina, aumentan su actividad y el número circulante de ellas en el organismo (Angeli et al. 1988).

La melatonina también afecta a la inmunidad adaptativa, lo hace principalmente mediante el aumento en la producción de citoquinas a través de la activación de monocitos, células Th1 y células NK (García Maurino, 1997). Además de su acción estimulante en la producción de diversas citoquinas la melatonina también tiene acción directa sobre las células inmunocompetentes, como el aumento en la supervivencia de los precursores de linfocitos B o células B maduras gracias fundamentalmente a su efecto antiapoptótico (Yu et al. 2000).

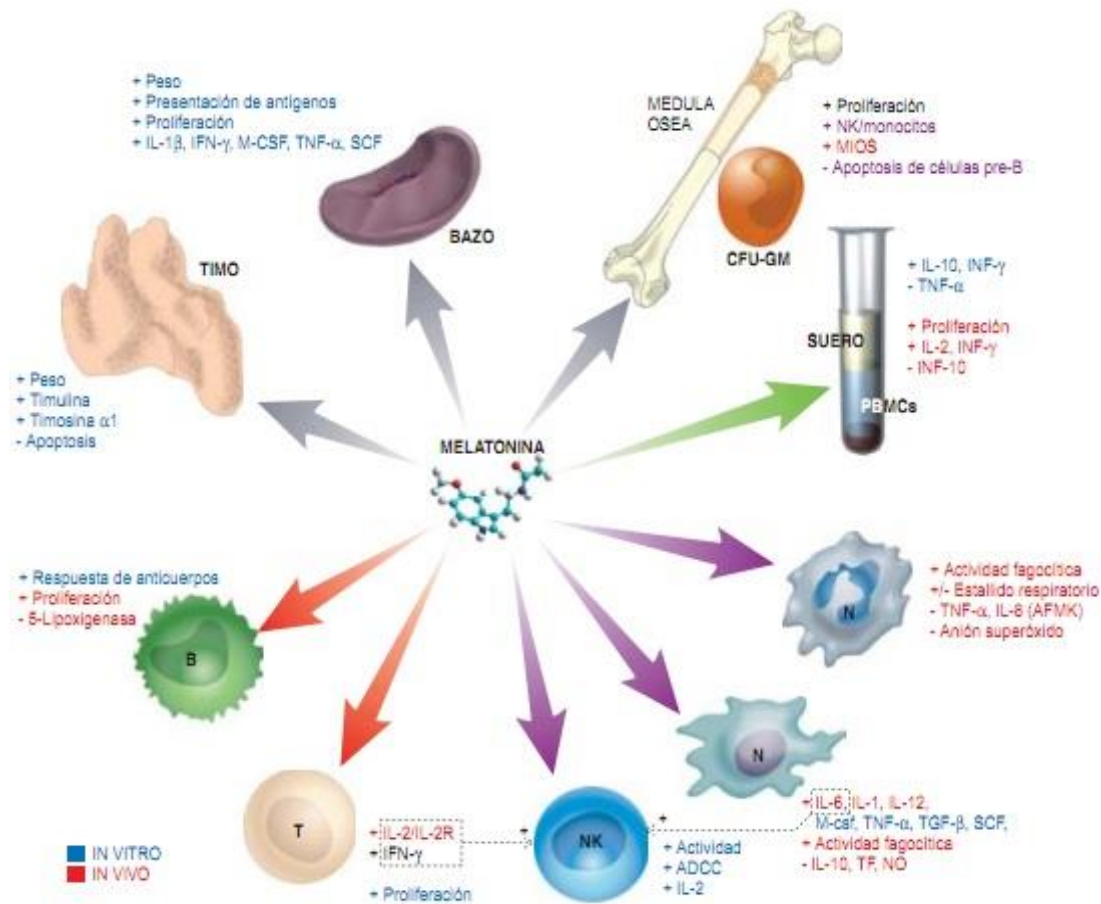


Figura 5. Efectos de la melatonina sobre el sistema inmunitario (Tomado de Carrillo-Vico et al., 2013).

Melatonina y reproducción

Uno de los aspectos más estudiados de la melatonina es su relación con la pubertad y la maduración sexual. Esta relación se empezó a intuir a principios del siglo XX, debido a que en niños se estableció una correlación entre la aparición de tumores en la glándula pineal con cuadros de pubertad precoz.

Este fenómeno parece justificarse en la disminución progresiva en los niveles de melatonina desde el nacimiento hasta la edad adulta, siendo este descenso más acusado al inicio de la pubertad (Lemaitre et al. 1981). Esto se debe a que la melatonina parece jugar un papel importante en la regulación y síntesis de gonadotrofinas. Su función la realiza a dos niveles: en el hipotálamo inhibe la producción de GnRH y en la hipófisis inhibe la producción de LH/FSH. Estas dos acciones nos permiten explicar el por qué aumentos o descensos en los niveles de melatonina afectan al desarrollo sexual del individuo. (Rojanski et al. 2000).

Función antioxidante

El estrés oxidativo es el proceso de deterioro celular dependiente de la producción de radicales libres que se produce debido a un aumento de los agentes oxidantes resultantes del metabolismo aeróbico normal, pero que en alto número pueden llegar a ser tóxicos para el organismo. Estos agentes oxidantes se denominan especies reactivas del oxígeno (ROS) (Ames N et al, 1993).

En condiciones de normalidad, las ROS y el sistema antioxidante se encuentran en equilibrio lo cual evita el daño oxidativo. Estos antioxidantes se encargan de disociar los ROS en agua y oxígeno. Encontramos diversos tipos de antioxidantes:

- Antioxidantes enzimáticos los cuales actúan a nivel celular. En este grupo encontramos la superóxido dismutasa y catalasa.
- Antioxidantes no enzimáticos. Aquí se sitúan la vitamina E, vitamina C, glutatión y beta-caroteno.

Como hemos comentado antes, un desequilibrio entre el sistema antioxidante y los ROS desencadenarían un estado de estrés oxidativo, el cual aparece en estados patológicos como son las neoplasias en las cuales los ROS que se encuentran en aumento interaccionan con el DNA. También hay estudios que afirman que guardan relación con otras patologías como el fallo cardíaco o la aterosclerosis (Givertz MM 2015). En la literatura podemos encontrar multitud de publicaciones científicas que avalan el papel de la melatonina como antioxidante, ésta se encarga de depurar el radical hidroxilo dando lugar a la 3-OHmelatonina cíclica, que se puede emplear como marcador de estrés oxidativo (Tan et al. 2003). La acción antioxidante de la melatonina es más efectiva que la de las vitaminas, lo cual se debe en parte a su carácter tanto liposoluble como hidrosoluble, pudiendo alcanzar todos los compartimentos celulares. Además, la melatonina actúa regulando la expresión de diferentes enzimas antioxidantes como SOD, catalasa, GPx, GRd (Antolín et al. 1996). Por otra parte, se ha descrito que además de promover la síntesis de enzimas antioxidantes la melatonina inhibe la producción de enzimas prooxidantes como la óxido nítrico sintasa.

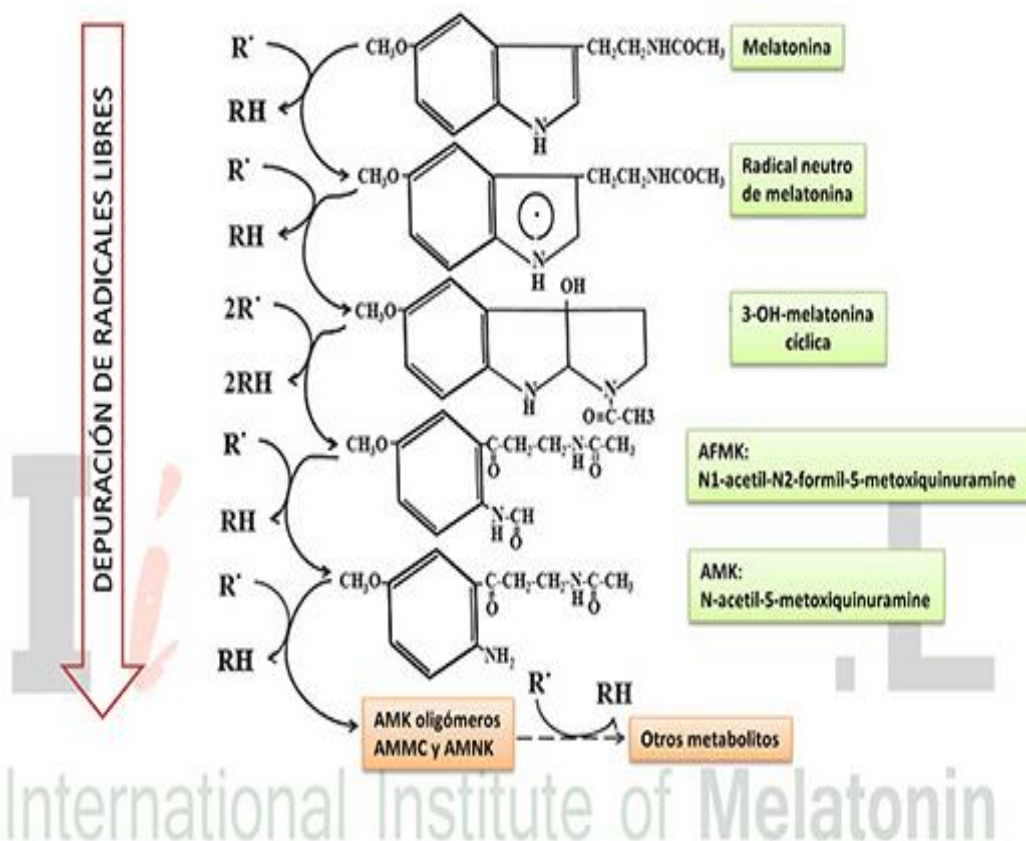


Figura 6. Efectos de la melatonina sobre la depuración de radicales libres (Tomado de Instituto Internacional de la Melatonina).

Mecanismos de acción antitumorales

El papel de la melatonina ha sido extensivamente estudiado a lo largo de las últimas décadas en diferentes tipos de tumores, especialmente en los cánceres de mama hormono-dependientes. La melatonina ejerce sus efectos antitumorales gracias a diversos mecanismos de acción, entre los cuales encontramos:

Acciones antiestrógenicas

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas dentro de las cuales encontramos el estradiol, la estrona y el estriol, que se sintetizan en los ovarios y tejidos periféricos como la grasa subcutánea en mujeres, y en los testículos en varones. Los estrógenos realizan su función debido a una serie de vías de señalización intracelulares conocida como señalización estrogénica, desencadenada mediante la unión del estradiol a los receptores de estrógenos, que actúan como factores de transcripción que tras su unión al estrógeno se traslocan al núcleo activando la transcripción de diferentes genes.

La melatonina actúa regulando la síntesis de estrógenos mediante la regulación de tres enzimas: la aromatasa que es la encargada del paso de andrógenos a estrógenos, la 17-HSD tipo 1 que cataboliza el paso de formas oxidadas a reducidas y sobre la estrógeno sulfatasa encargada de activar a los estrógeno sulfatos (Cos S et al., 2008).

Además de actuar sobre la síntesis de estrógenos, la melatonina también se encarga de regular la actividad del receptor de estrógenos del que previamente hemos hablado, el cual tiene un papel fundamental en la patogenia del tumor mamario. Esta acción la realiza mediante dos mecanismos fundamentales:

- Uno directo mediante el cual inhibe el crecimiento de la célula tumoral modulando el receptor estrogénico alfa disminuyendo su expresión (Proietti et al. 2013). Esta función tiene su explicación en el hecho de que la expresión del receptor alfa es mucho más abundante en los tumores que la expresión del receptor estrogénico beta.
- Otro indirecto, a través de su acción inhibitoria del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, lo cual disminuye los niveles circulantes tanto de estrógenos como de prolactina. Ambas hormonas juegan un papel importante en el crecimiento tumoral. Además, la melatonina regula la síntesis y transformación de estrógenos mediante el efecto anti17-HSD tipo 1, anti estrógeno sulfatasa y antiaromatasa (Cos S et al., 2008; Martinez-Campa et al., 2009).

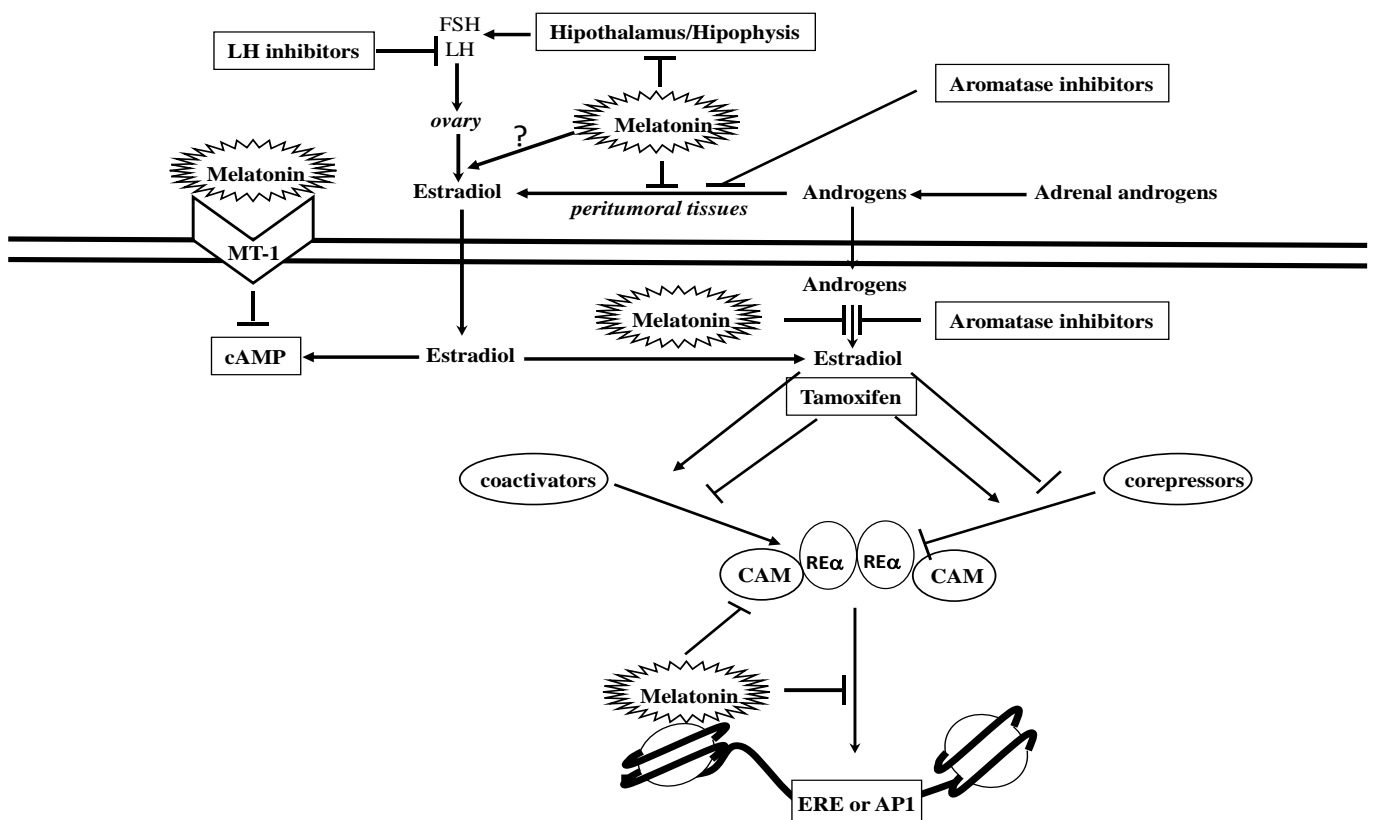


Figura 7. Acciones antiestrogénicas de la melatonina en células de cáncer mamario hormono-dependientes (Tomado de Menéndez-Menéndez y Martínez-Campa, 2018).

Modulación del ciclo celular

Los tumores se desarrollan debido a una pérdida del equilibrio entre la proliferación y la muerte celular. La melatonina ejerce un importante efecto modular anti-oncogénico

actuando sobre el ciclo celular y regulando así el balance proliferación/apoptosis. Dentro del ciclo celular encontramos diferentes fases:

- La interfase es el período que transcurre entre dos mitosis consecutivas y está compuesta por G1, S y G2. En G1 se producirá el crecimiento celular necesario para la posterior replicación y división del DNA y además de esto, se modificará el ambiente interno para adecuarlo a las condiciones necesarias para entrar en la fase S. En G1 encontramos el primer punto de control, en el cual se decide si la célula entra en fase M; para ello se evaluarán las condiciones tanto intra- como extracelulares, entre otras cosas influirán la existencia de factores como la disponibilidad de nutrientes o posibles daños en el DNA. En función del paso o no de este punto de restricción la célula entra en fase M o pasa al estado G0 o de quiescencia. En la fase S se producirá la replicación del DNA y en la fase G2 volveremos a encontrar crecimiento celular y monitorización del ambiente externo e interno. Aquí además, se localiza el segundo punto de control, que al igual que el de G1 decidirá si la célula pasa a fase M o no.
- La fase M o de mitosis se define como la división tanto del material genético como del citoplasma de una célula dando como resultado dos células hijas con el mismo número de cromosomas e información genética que la célula madre.

Este ciclo que acabamos de describir está regulado de forma estricta fundamentalmente por las quinasas dependientes de ciclinas o CdKs, las cuales además de necesitar la unión a ciclinas deben estar fosforiladas para ejercer su función. Encontramos diversos tipos de ciclinas, las más importantes en la regulación del ciclo celular son A, B, D y E. D y E van a actuar principalmente sobre el punto de control de G1. Estos reguladores van a activarse si las condiciones son favorables para que se desarrolle el ciclo celular, mientras que se inactivan si no encuentran los factores predisponentes.

Si la célula encontrara señales negativas en alguno de los puntos de control, en condiciones fisiológicas, se produce un aumento en la expresión del gen p53, cuya función es la detención del ciclo en las fases G1/S o G2/M. En condiciones normales la expresión de este gen es baja ya que se encuentra asociada a Mdm2, lo cual induce su destrucción por el proteosoma, si p53 no se encuentra en los niveles adecuados, lo cual sucede en situaciones de estrés o daño del DNA ejercerá su función de forma aberrante deteniendo el ciclo celular.

Los efectos de la melatonina sobre el ciclo celular fueron demostrados en células de cáncer mamario MCF-7, células mieloides HL-60 y células de hepatocarcinoma HepG2). Encontramos tres mecanismos mediante los cuales ejerce su función:

- Prolongación de la fase G1 y G0, esta acción la desarrolla, al menos parcialmente, gracias a la regulación que ejerce sobre p53 y p21 (Mediavilla et al. 2010). Gracias al aumento en la acción de p53 y p21 que actúan hipofosforilando las quinasas se puede detener la entrada en fase M de las células, lo que impediría que siguieran dividiéndose.

- Retraso en la entrada en fase S, el cual se explica debido a la disminución en la síntesis de DNA (Cos et al., 1996).
- Secuestro en la fase G2/M, esta acción la ejerce debido a la inhibición de la ciclina D (Cos et al., 1996).

Todos estos efectos apoyarían el uso de la melatonina como terapia adyuvante en diferentes procesos tumorales.

Efectos sobre la diferenciación celular

La diferenciación celular es el proceso por el cual las células de un linaje celular concreto sufren modificaciones en su expresión génica, para adquirir la morfología y las funciones de un tipo celular específico y diferente al resto de tipos celulares del organismo (Fuster V et al). Normalmente los tumores mejor diferenciados tienen mejor pronóstico que los poco diferenciados.

La melatonina va a inducir la diferenciación celular tanto en celular normales como en tumorales (neuroblastoma, MCF-7, prostáticas). Esta acción la va a ejercer debido a la prolongación que ya hemos explicado del ciclo celular el cual induce a una mayor tasa de diferenciación. El otro mecanismo de acción lo ejerce a través de las uniones GAP, que son las encargadas de establecer y mantener la comunicación intercelular. Estas uniones GAP están alteradas en células tumorales impidiendo la comunicación entre células necesaria para regular el crecimiento. La melatonina ha demostrado que favorece dicha comunicación (Cos et al., 2006).

Apoptosis

La apoptosis es una vía de destrucción o muerte celular programada provocada por el organismo con el fin de controlar su desarrollo y crecimiento, puede ser de naturaleza fisiológica y está desencadenada por señales celulares controladas genéticamente. (Lozano et al. 2009). Este proceso tiene una función muy importante en nuestro organismo ya que controla la el desarrollo celular indiscriminado, que tiene lugar en los procesos tumorales.

Los procesos de la apoptosis pueden ser activados tanto por inducción negativa (pérdida de actividad supresora, falta de factores de crecimiento o disminución de los contactos con las células que la rodean) como positiva (debido a la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictivas) (Jordan J, 2003).

Encontramos dos vías apoptóticas:

- Vía extrínseca, la cual se encarga del inicio de la apoptosis, la cual se encuentra involucrada por interacciones mediadas por receptores transmembrana los cuales son ricos en cisteína. Entre estos receptores encontramos el factor de necrosis tumoral (TNF), los cuales se conectan a complejos como el TRADD que actúa como una plataforma de adaptación para reclutar moléculas de señalización y activa factores de transcripción (NFκ y JNK/AP-1), TNF raramente activa procesos de apoptosis a menos que esté bloqueada la síntesis de proteínas

(González D et al., 2014). Los receptores Fas se enlazan con FADD activando caspasas 8 y 10, las cuales activan las endonucleasas citoplasmáticas que degradan el material nuclear y proteasas que degradan proteínas nucleares y citoesqueletos. Por último, los receptores de glutamato, trombina y canales iónicos dependiente de voltaje desempeñan una función fisiológica pero su sobreactivación puede conducir también a la muerte celular.

- Vía intrínseca, la cual como su propio nombre indica se induce intracelularmente. Esta vía puede ser desencadenada por daño en el DNA, grandes aumentos del calcio citosólico (Lozano GM et al., 2009) o estrés celular, así como un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (González D et al., 2010). Esto activa la expresión del gen supresor de tumores p53 el cual mediante dos proteínas pro-apoptóticas activa Bcl2 la cual aumentará la permeabilización mitocondrial promoviendo la liberación de citocromo C y Apaf-1. Estas dos moléculas unidas a la procaspasa-9 forman el apoptosoma que activará la caspasa-9 que pondrá en marcha una cascada de señalización activando a diferentes caspasas.

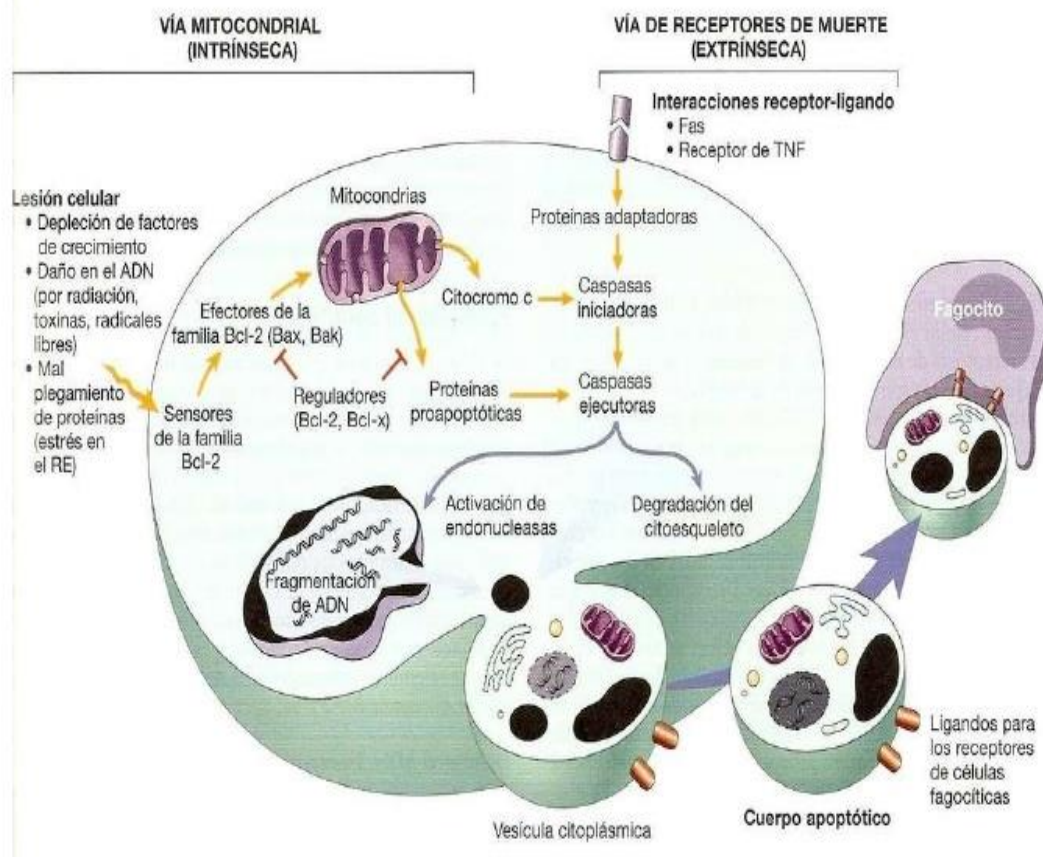


Figura 8. Vías de apoptosis (Tomado de de <https://introduccionapoptosis.wordpress.com>).

El papel de la melatonina en la regulación de la apoptosis no está del todo definido debido a que no está claro a si ejerce su acción en función de la línea celular o del estado oxidativo de la célula. Vamos a encontrar tanto efecto pro- como anti-apoptótico:

- En células no tumorales predominan los efectos anti-apoptóticos: ejerce este efecto en células normales mediante diversos mecanismos como la reducción de los niveles de expresión del receptor de glucocorticoides (Sainz et al., 1999). También es capaz impedir la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citoplasma. La melatonina inhibe la vía intrínseca mediante la regulación de la proteína pro-apoptótica Bax (Hoijman et al., 2004). Encontramos diversos estudios que han demostrado la eficacia de la melatonina como agente anti-apoptótico tanto en células inmunes (Sainz et al., 1999) y tejidos periféricos (Nava et al., 2000).
- En células tumorales, predominan los efectos pro-apoptóticos, que se deben al incremento de la expresión de p53 y p21 y a la liberación citosólica del citocromo C, regulación positiva de Bax y la inducción de caspasas 8 y 9 (revisado en Mediavilla et al., 2010).

Inhibición de la actividad de la telomerasa

La telomerasa es una enzima formada por un complejo proteína-ácido ribonucleico con actividad polimerasa que está presente en células de la línea germinal, en tejidos fetales y en ciertas células poco diferenciadas, que replica el DNA en los extremos de los cromosomas y permite el alargamiento de los telómeros. La telomerasa es reprimida en las células somáticas maduras después del nacimiento, produciéndose un acortamiento del telómero después de cada división celular. Su activación desempeña un papel importante en la carcinogénesis ya que proporciona una capacidad de división ilimitada. Vamos a encontrar una actividad de la telomerasa aumentada en un 85-90% de los cánceres. La expresión de la subunidad hTERT está relacionada con la actividad de la telomerasa.

En células normales la melatonina aumenta la actividad de la telomerasa, tratando de retrasar el envejecimiento celular, sin embargo, en células tumorales MCF-7, la expresión del mRNA de hTERT es inhibida por la melatonina mediante la activación de los receptores nucleares.

La presencia de un ERE en el promotor de hTERT explica la capacidad de los estrógenos para activar la telomerasa, este efecto solo lo encontramos en células con receptor estrogénico (León-Blanco et al., 2003, Martínez-Campa et al., 2008).

Efectos anti-angiogénicos

Todas las células de nuestro organismo, tanto las normales como las tumorales, necesitan de un correcto aporte de oxígeno y nutrientes los cuales dependen del desarrollo de nuevos vasos sanguíneos o angiogénesis. Por lo tanto la inhibición de la angiogénesis constituye otra estrategia en el tratamiento de los tumores. El desarrollo de nuevos vasos sanguíneos está promovido por situaciones de hipoxia celular, la cual induce la expresión del Factor Inducido por Hipoxia (HIF), el cual se

une a elementos de respuesta que a su vez llevan a la expresión de diferentes genes como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), anhidrasa carbónica IX (CAIX), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) o el TGFalfa. En pacientes con tumores se pueden encontrar niveles anormalmente altos de VEGF que se relacionan con un crecimiento tumoral rápido y metástasis precoces. Además, existen otras células que secretan estos factores, como las células endoteliales, los macrófagos, los mastocitos, y los fibroblastos (Biocancer Research journal [internet]; Ribatti D, 2008)

La primera descripción de las propiedades anti-angiogénicas de la melatonina se mostró en un estudio clínico que describía la caída de los niveles de VEGF en pacientes oncológicos tratados con esta indolamina (Lissoni et al., 2001). Otros estudios más recientes con células de cáncer de próstata (DU145, PC-3 y LNCaP) afirma que las concentraciones farmacológicas de melatonina inhiben la expresión de la proteína HIF-1alfa (revisado en Mediavilla et al., 2010). Este mecanismo también ha sido apoyado en un estudio sobre células de cáncer de mama (Álvarez-García et al., 2013) Además de esta acción la melatonina gracias a su efecto antioxidante previamente explicado neutralizaría los ROS producidos por la hipoxia, estabilizando así el factor HIF. Todos estos datos nos orientan hacia una estrategia prometedora en la limitación de la progresión del cáncer, planteándose así una posibilidad terapéutica innovadora (González A et al., 2015).

Inhibición de las metástasis

La metástasis tumoral es el proceso de diseminación del cáncer de una parte del cuerpo donde se formó a otra. Este proceso ocurre mediante la circulación o por vía linfática y el tumor que se desarrolla es de la misma línea germinal que el original. En este proceso de invasión tumoral vamos a distinguir tres etapas: a) Reconocimiento e interacción con la matriz extracelular; b) adhesión a la membrana basal; c) Degradación de la matriz y migración para formar el tumor secundario (Zeeshan R et Mutahir Z, 2017).

La melatonina va a tener un efecto opuesto al del estradiol en este proceso de migración. Con dosis fisiológicas de melatonina logramos incrementar la expresión de b1-integrina y E-cadherina, que son dos moléculas implicadas en las interacciones tanto célula-célula como célula-matriz. De esta forma con la melatonina logramos reducir la invasividad y promover la diferenciación (Cos et al., 1998). En un estudio publicado en 2016 por Borin et al., se ha demostrado la eficacia de la melatonina controlando las metástasis del cáncer de mama tanto *in vitro* como *in vivo*, gracias al antagonismo de mecanismos celulares basados en la inhibición de ROCK-1. También se ha demostrado que la melatonina incrementa el desarrollo de microfilamentos y placas de adhesión local en células tumorales (Benitez-King et al., 2009).

Los microRNAs

El primer miRNA fue identificado hace aproximadamente 30 años en *Caenorhabditis elegans*, un nemátodo, y se le asignó el nombre de lin-4 (Horvitz HR et al, 1980). En un principio se creía que se trataba de un gen convencional codificante para proteínas, hasta que en el año 1983 los laboratorios de Ruvkun y Ambros demostraron que se trataba de un nucleótido de 22 nucleótidos regulador de los mRNA (Lee RC et al., 1993). Además descubrieron en el mismo nemátodo otra secuencia de nucleótidos (lin-14) otro miRNA encargado de regular la producción de la proteína LIN-14. Estos descubrimientos en principio no tuvieron en principio mucha transcendencia, ya que se produjeron en *C. elegans*, hasta el aislamiento de un segundo miRNA, let-7. (Wightman B et al., 1993). Let-7 atrajo mucho más interés por parte de la comunidad científica debido a que se encuentra presente en diversos organismos, incluido humanos.

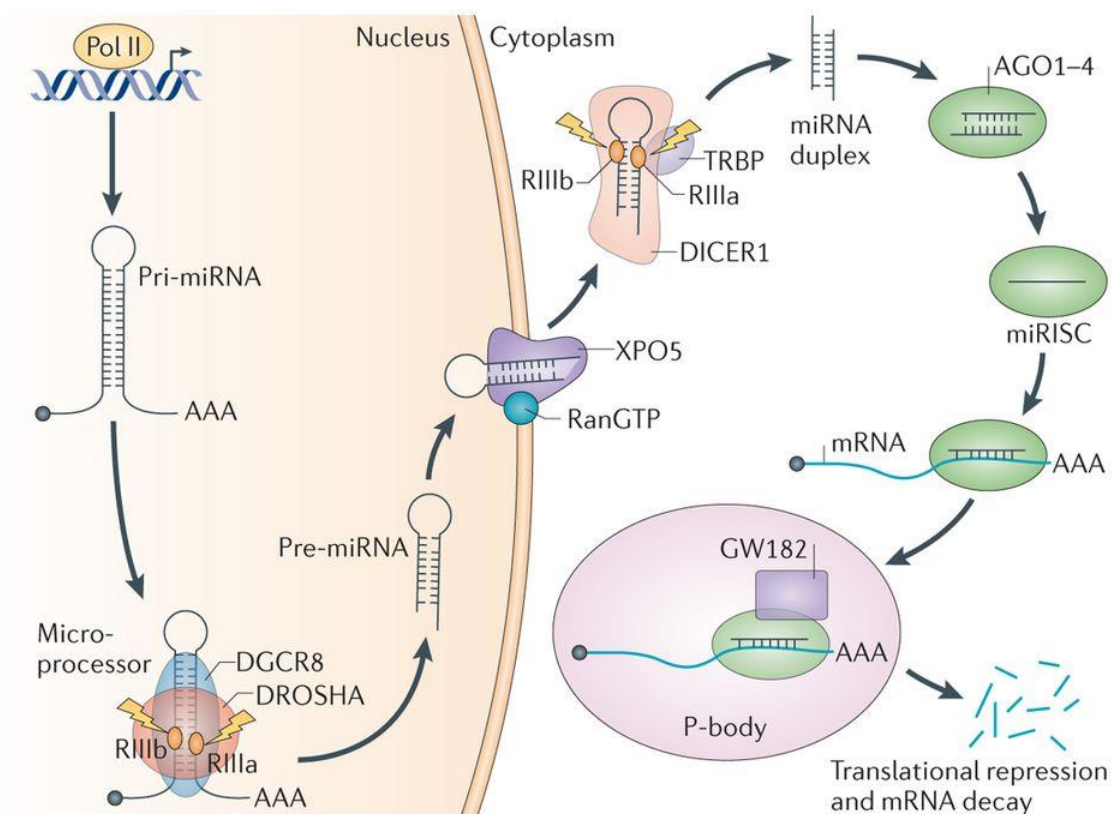
Un miRNA puede ser definido como una clase de RNAs no codificantes que va a tener una función como regulador de la expresión génica, que presenta una longitud de entre 19 y 25 nucleótidos que se unen al mRNA bien promoviendo su degradación o bien inhibiéndolo. (Bentwich et al., 2005). Actualmente se encuentran registrados más de 30.000 miRNAs de los cuales se calcula que un 30% se encargan de regular genes codificantes de proteínas en humanos (Kent y Mendell, 2006).

Los miRNAs van a ser transformados secuencialmente en diferentes etapas pasando por una serie de moléculas precursoras y son codificados por genes denominados genes miRNA (Bartel DP, 2004); estos genes que codifican los miRNA están conservados evolutivamente y pueden estar situados dentro de intrones o exones de genes que codifican proteínas (70%) o en áreas intergénicas (30%) (Rodriguez et al., 2004). La mayoría de estos miRNAs se orientan en paralelo con su gen anfitrión, lo que sugiere que se transcriben de forma simultánea.

Biogénesis de los miRNAs

Todas las familias de miRNAs sufren una serie de etapas comunes que los lleva del miRNA primario al miRNA maduro de aproximadamente 22 nucleótidos. Desde la información contenida en el DNA se genera un pri-miRNA, que es reconocido por las proteínas DROSHA/DGCR8; DROSHA (ARNSEN en humanos), es una proteína ubicada en el núcleo, que presenta dos dominios ARNasa, un dominio de unión al ARN de doble hebra y otra serie de dominios conservados de los que aún no se sabe a ciencia cierta su función. DGCR8 es una proteína de unión al ADN que posiciona a DROSHA a una distancia adecuada en la cadena de nucleótidos. La acción de DROSHA/DGCR8 genera un pre-miRNA que pasa al citoplasma donde será reconocido por DICER, una ribonucleasa miembro de la familia de las ARNasa III, que generará un dúplex sin bucle, donde posteriormente solo quedará una hebra que se encargará de actuar sobre el mRNA llevándolo a la inhibición de su expresión o a su degradación. Esta es la ruta canónica que se produce en la mayoría de los mamíferos, aunque encontramos diversas variantes más o menos distintas de este mecanismo general. El proceso lo podemos dividir en las siguientes etapas:

- **Transcripción:** los genes miRNA se encuentran localizados por todo el genoma. La característica común entre todos los genes miRNA es la estructura tallo-bucle o tallo-lazo (del inglés *stem-loop*). De la transcripción de estos miRNA se encarga la RNA polimerasa II, quedando formado el pri-miRNA (Lee Y et al., 2004), este miRNA primario sufren los mismos procesos de splicing y poli-adenilación que los mRNAs codificantes de proteínas.
- **Drosha y Dicer:** El pri-miRNA requiere de dos pasos sucesivos mediados por endonucleasas para adoptar su estructura activa. El primero en ocurrir es el mediado por la enzima Drosha, el cual tiene lugar en el núcleo celular; posteriormente, el pri-miRNA es exportado al citoplasma mediante la acción de la Exportina5. En el citoplasma tiene lugar la acción de Dicer, que al igual que Drosha asocia su acción a una proteína de unión a RNA (TRBP) (Chendrimada TP et al., 2005).
- El último paso es la incorporación a RISC, un complejo proteico cuya composición no está clara pero cuyo componente principal es la proteína Argonauta, de la cual se han descrito cuatro variedades en humanos. (Hammond SM et al., 2001). Este complejo se encargará de producir el silenciamiento del mRNA.



Nature Reviews | Cancer

Figura 9. Biogénesis de los miRNAs (Tomado de MicroRna biogenesis pathways in cáncer de Shuibin L y Richard G, 2015).

Como hemos mencionado anteriormente, ésta es la vía habitual de síntesis de miRNA, pero encontramos diversas variantes. La más común de éstas es la que se produce en la clase mirtron, que son un tipo de miRNA que se localiza en intrones, y que no sufrirá la acción de Drosha (Cheloufi S et al., 2010).

Es generalmente aceptado que los miRNAs maduros regulan la expresión génica mediante la unión a la región 3' no traducida (3'-UTR) del mRNA diana, provocando la degradación de éste o la inhibición de su traducción. El miRNA maduro es parcialmente complementario a uno o varios miRNA, la especificidad en la elección de destino de los miRNAs se define principalmente por la complementariedad de la secuencia entre los sitios de destino del mRNA y la secuencia de nucleótidos de la posición 2-8 en el extremo 5' del miRNA conocido como Región *seed* (Berstein et al., 2001).

En eucariotas la degradación del mRNA puede ocurrir mediante dos vías, donde cada una de ellas es iniciada por un acortamiento gradual de la cola poliA del mensajero. En el primer caso, la secuencia del mRNA puede ser degradada en sentido 3'-5' por una progresiva descomposición, por exosoma, o en el segundo caso por extracción de la caperuza seguido por la degradación de la hebra en sentido 5'-3', catalizada por la exonucleasa XRN1 (Filipowicz et al., 2008). Los niveles de los mRNA son controlados por ribonucleoproteínas (RNPm).

Mecanismos de silenciamiento y regulación de los miRNAs

Como hemos explicado anteriormente, los miRNAs se unen a la región 3'UTR del transcrito, donde inician la degradación del mRNA o inhiben su traducción. Mediante los enfoques de la bioinformática, diversos programas como miRanda, Pictar, Targetscan o Tarbase han permitido predecir miles de genes que son potencialmente regulados por miRNAs (Shirdel et al., 2011) basados en la complementariedad de secuencias, si bien también es cierto que se han identificado un gran número de falsos positivos hasta el momento.

Encontramos diversos mecanismos que nos explican la pérdida de función de un miRNA entre los que se incluyen la eliminación genómica, mutaciones, silenciamiento epigenético, y/o alteraciones en el procesamiento del miRNA (Nakamura et al., 2007). Existen dos estudios que proporcionan información acerca de los mecanismos de regulación de miRNAs donde se establece que la interrupción de la interacción de un solo miRNA y su mRNA objetivo puede producir un fenotipo anormal en células de mamífero. Además, existe la evidencia de que los miRNAs están regulados indirectamente a través del control de sus enzimas de procesamiento. (Mayr et al., 2007).

En este mismo sentido encontramos diferentes estudios que relacionan una regulación negativa de los miRNAs con el cáncer en humanos, como por ejemplo la inactivación por hipermetilación en el miR-124a.

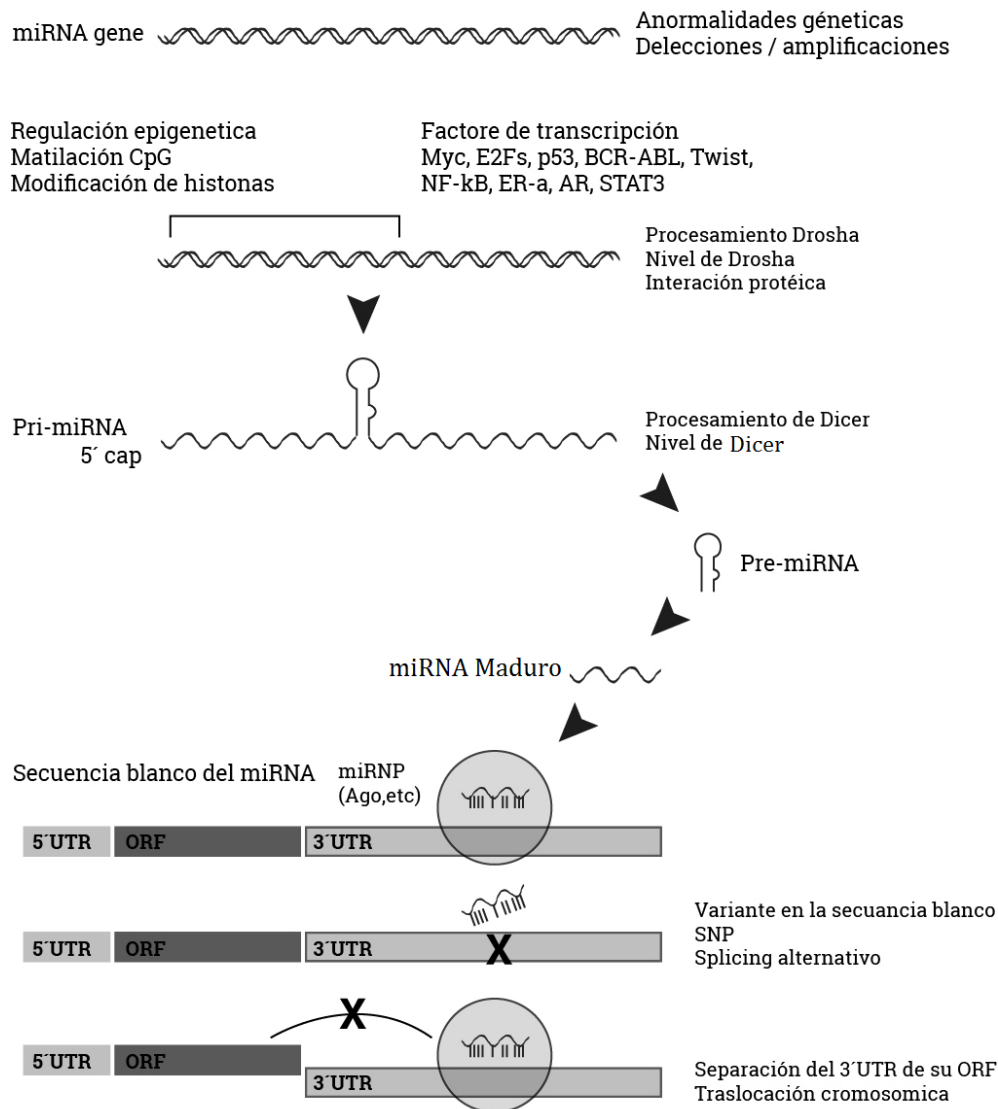


Figura 10. Mecanismos de regulación de los miRNAs, se indican los diferentes mecanismos que pueden alterar la acción de un miRNA (Tomado de Yong et al., 2009).

Papeles biológicos de los miRNAs

La importancia biológica de los miRNAs en el desarrollo embrionario de los mamíferos fue demostrada por primera vez en ratones con deficiencia para Dicer y DGCR8. La pérdida de estas dos enzimas dio como resultado la muerte en período embriológico (Berstein E et al, 2003). La inactivación de estas dos enzimas daba como resultado la pérdida de todos los miRNAs menos lo que hemos nombrado anteriormente que seguían una ruta alternativa de síntesis.

Por otra parte, numerosos estudios han demostrado una segunda función de los miRNAs en el mantenimiento de la homeostasis tisular, como por ejemplo miR-208 que se

encuentra en relación con el desarrollo cardíaco y cuya deficiencia se relaciona con hipertrofia cardíaca (Van Rooij E et al., 2007).

En diversos estudios de sobreexpresión de miRNAs se han establecido diferentes funciones de éstos, como su relación con numerosos aspectos de la función neuronal, incluyendo el desarrollo de la memoria (Griggs EM et al., 2013).

Papel de los miRNAs en diversas enfermedades.

Diversos estudios han demostrado la relación entre la expresión de diferentes miRNAs y un amplio abanico de enfermedades. En multitud de casos se ha conseguido establecer una relación causal entre la progresión de la enfermedad y la pérdida de la regulación del miRNA. Algunos de los ejemplos mejor caracterizados se describen brevemente a continuación:

- **Enfermedad metabólica:** se han establecido numerosas relaciones entre miRNAs y diversas vías metabólicas, entre las que se incluyen la del metabolismo y transporte del colesterol y ácidos grasos, la función de los islotes pancreáticos y el metabolismo de la glucosa (Fernandez-Hernando C et al., 2013). La delección de miR-122 (un miRNA específico hepático) en ratones tiene como consecuencia una disminución de la concentración de colesterol y triglicéridos séricos (Hsu SH et al., 2012). El miR-33 ha sido relacionado con la concentración de HDL y TAGs, aunque en este caso no está claro si se trata de un miRNA específicamente hepático como el anterior o también ejerce otros papeles en tipos celulares diferentes, como puede ser su posible implicación en la expresión de macrófagos. Ambos miRNAs continúan siendo investigados como potenciales dianas terapéuticas.

Diversas familias de miRNAs han sido relacionadas con el metabolismo de la glucosa, como por ejemplo miR-375 que se encuentra altamente expresado en las células de los islotes pancreáticos y regula un gran número de genes involucrados en la proliferación y función de las células pancreáticas (Poy MN et al., 2004). Por otro lado la sobreexpresión de Let-7 conlleva a una reducción en la tolerancia a la glucosa (Frost RJ et al., 2011).

- **Patogénesis viral:** en los últimos años han aparecido diversas conexiones entre miRNAs y la biología vírica. En el año 2015 se han establecido hasta 522 miRNAs que guardan alguna relación con diversos virus, en su mayor número con la familia herpesvirus (Griffiths-Jones S et al., 2006). Estos miRNAs no parecen esenciales para la replicación vírica pero si hay estudios que evidencian su alta importancia en la patogénesis (Cullen BR, 2011). Diversos estudios han establecido la relación entre los miRNAs virales y la transición de las fases de latencia/activación además de la respuesta inflamatoria del huésped. De esta manera, esto parece sugerir la posibilidad de encontrarnos ante una interesante diana terapéutica ya que estos miRNAs no se encuentran en los humanos y su alteración no alteraría ninguna función biológica.

El ejemplo mejor establecido es el caso de miR-122 y el virus de la hepatitis C. Este miRNA se encuentra altamente expresado en hepatocitos y es requerido

para una eficiente replicación del HCV. El miR-122 promueve la replicación del virus mediante la promoción de la estabilidad del RNA vírico, al contrario de la función clásica de los miRNA que tratan de reducir la estabilidad del mRNA. La inhibición de miR-122 parece una diana prometedoras con el fin de reducir la estabilidad y replicación del virus (Shimakami T et al., 2012).

- **Caquexia:** es un síndrome que consiste en la pérdida de las proteínas musculares y la materia grasa, con una importancia clínica importante, y que se relaciona con diversas enfermedades, como diabetes, fallo cardíaco y cáncer. Se trata de un síndrome incurable y que se relaciona con procesos malignos como el cáncer de pulmón y de páncreas. Su tratamiento resulta muy complejo ya que estos pacientes no se pueden tratar como una desnutrición normal ya que esto conduciría a su muerte. La pérdida del músculo durante la caquexia es el resultado de la degradación de proteínas subsecuente a la alteración del metabolismo en respuesta a la progresión tumoral. (Sandri M, Carraro U, 1999). Se ha establecido relación entre miR-206, mir-21 y la atrofia muscular debido a que activan los factores YY1 y eIF4E3 que están en relación con el catabolismo muscular (Soares RJ et al., 2014). Además, la sobreexpresión del factor de transcripción Pax7 se relaciona con la pérdida de masa muscular en pacientes con cáncer de páncreas. Por último, en estudios recientes se ha relacionado la caquexia con el alto nivel de microvesículas que contiene miR-21 en cáncer pancreático y pulmonar.

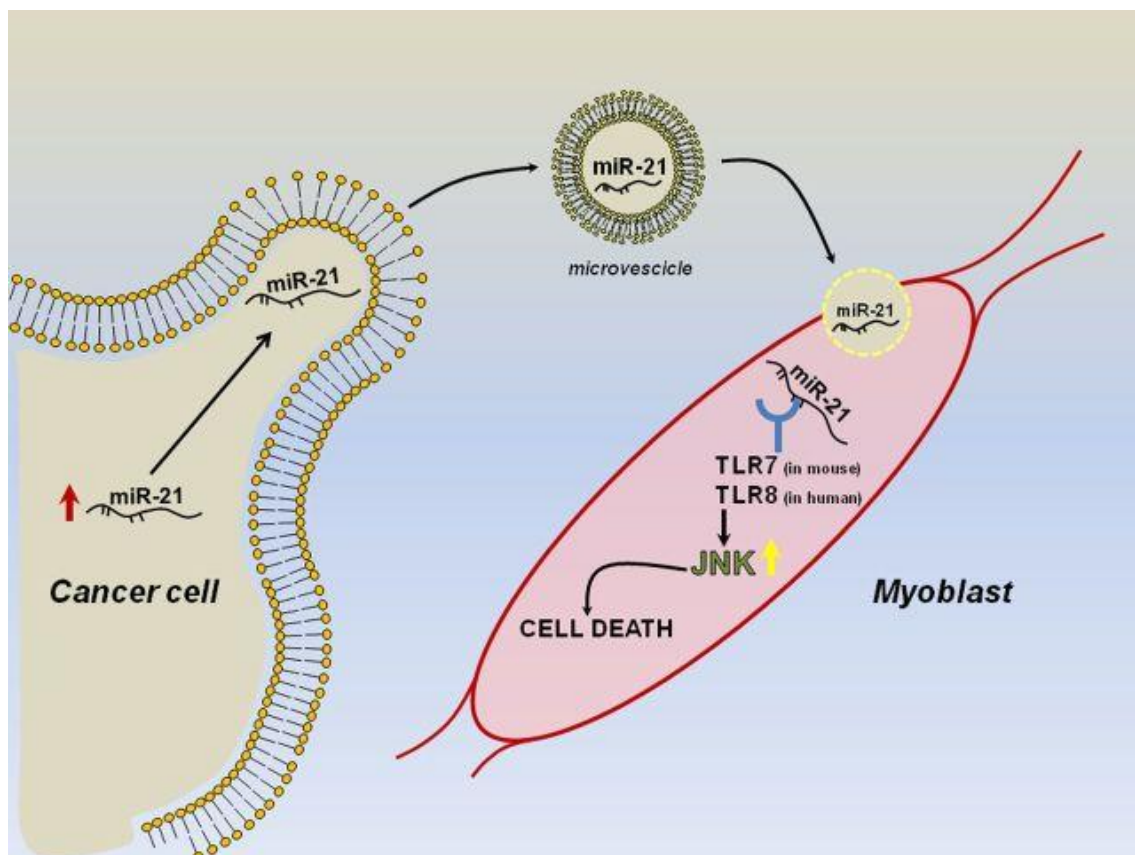


Figura 11. Representación esquemática de la función de miR-21 en la caquexia (Imagen obtenida de Acunzo, 2015).

Papel de los miRNAs en el cáncer

Una manera de clasificar y denominar a los miRNAs está basada en el efecto que generen los miRNAs sobre su gen diana. De esta manera, encontramos miRNAs oncogénicos (oncomirs) que promueven el desarrollo de tumores, regulando e inhibiendo genes supresores de tumores o controlando los genes que intervienen en la diferenciación celular o apoptosis.

Características en cáncer	Funciones de los miRNAs	miRNAs
Resistencia a señales antiproliferativas e independencia a factores exógenos de crecimiento	Pro-proliferativos	miR-21, Familia miR-17, miR-221, miR-222
Evasión de apoptosis	Anti-proliferativo	Let-7, miR-519. miR-146a
	Pro-apoptóticas	Familia miR-34, miR-29, miR-15, miR-16
	Anti-apoptóticas	Familia miR-17-92, miR-21
Potencial limitado de replicación	Inmortalización o senescencia	miR-290, miR24, miR-34a
Inducción de angiogenesis	Pro-angiogenico	Familia miR-17-92, miR-378, miR-296, let-7f, miR27b, miR-130,miR-126.
	Anti-angiogenico	miR-15, miR-16, miR-20a, miR-20b.
Evasión del sistema inmune	Escape a inmunovigilancia	miR-155, Familia miR-17-92, mir-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373, miR-520c, hcmv-miR- UL112.
Invasión de tejidos y metástasis	Pro-metastásicos	miR-10b,miR-21, miR-373, miR-520c, miR-155.
	Anti- metastásicos	Let-7, miR-335, miR-206,miR-126, miR-146a, miR-101, miR-200
Inestabilidad genómica	Promotor de inestabilidad genómica	Deleción o regulación a la baja de miRNAs como miR-17, miR-20a, miR-15, miR-16 o let-7

Tabla 1 Funciones de diferentes miRNAs en cáncer. Descripción de características asociadas a procesos tumorales en cáncer de mama (Tomado y Adaptado de Kai Ruan et al., 2009).

Muchos miRNAs se ven altamente expresados en tumores debido a mecanismo epigenéticos o a la pérdida de regulación a nivel transcripcional (Cho WC, 2007). Dentro de los miRNAs identificados como oncomirs se encuentra el miR-21 que se encuentra involucrado en diversos procesos relacionados con el cáncer como la invasión y la migración. Diversos estudios han identificado esta sobreexpresión de miR-21 en células cancerosas en el cáncer de mama respecto a los niveles observados en tejido sano (Sempere et al., 2007; Frankel et al., 2008). Asimismo, se ha establecido la relación inversa entre miR-21 y la vía supresora de tumores p53.

Otro ejemplo es miR-27a que regula el gen ZBTB10 y que ha sido clasificado como un oncomir en el cáncer de mama ya que aumenta la actividad de cdc2/ciclina B lo que induce la proliferación celular.

Por otro lado, encontramos miRNAs supresores de tumores (anti-oncomirs) que pueden inhibir la tumorigénesis mediante la represión de oncogenes, a esta evidencia se ha llegado por primera vez tras el estudio de la interacción entre miRNA y las proteínas de la familia ErbB, la cual juega un papel importante en el desarrollo de organismos, proliferación celular y supervivencia de tumores epiteliales humanos (Yarden y Sliwkowsk, 2001). Erb2 se encuentra sobreexpresado en el 20-30% de células del cáncer de mama, y se identificó a miR-125a como regulador de éste. Otros miRNAs que se han identificado como supresores de tumores como let-7, miR-17-5p, miR-29, miR-34 y miR-127.

Por lo tanto cualquier modificación en los niveles de estos miRNAs se verá traducido en diversas alteraciones en las rutas de señalización biológicas las cuales afectan a diferentes etapas del desarrollo tumoral:

- **Evasión de la supresión tumoral:** Se ha demostrado que diferentes miRNAs participan regulando diversas vías de proliferación celular y la pérdida de su regulación será la responsable de la evasión y del mantenimiento de las señales proliferativas. Dentro de estos miRNAs podemos destacar el miR-17-92 los cuales actúan directamente sobre la expresión de E2F1, que tiene un papel importante en la transición de fase G1 a fase S en el ciclo celular. (Coller HA et al., 2007)
- **Aumento de la resistencia a la muerte celular:** se consigue mediante la puesta en marcha de una serie de mecanismos antiapoptóticos, regulados, al menos en parte, por miRNAs. Por ejemplo, se han encontrado diversos miRNAs que regulan al gen p53, que tiene una función de supresor tumoral; dentro de éstos encontramos miR-192, miR-194 y miR-215.
- **Activación de la invasión y metástasis:** hay evidencias que demuestran el papel importante que juegan los miRNAs en la transición mesenquimal-epitelial y en la metástasis. Entre otros factores importantes, los miRNAs miR-155 y miR-200 regulan la expresión del TGF- β .
- **Inducción de la angiogénesis:** este proceso mediante el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes con el fin de satisfacer

las necesidades de oxígeno y nutrientes en los tumores en crecimiento y metástasis también se encuentra regulado por miRNAs. El que aparece de forma más consistente en la literatura es miR-210, el cual aumenta sus niveles en condiciones de hipoxia y cuya sobreexpresión se relaciona con la formación de estructuras tipo capilar. (Peng Y, Croce CM, 2016)

Una nueva propiedad que se les está empezando a atribuir a los miRNAs es la de servir como marcadores de invasión tumoral. Como hemos explicado anteriormente, la metástasis representa un proceso complejo mediante el cual células de un tumor sólido primario invaden tejido adyacente y crecen en un tumor secundario. Dentro de este proceso juega un papel importante el gen CD44, el cual está implicado en la adhesión celular y diferentes componentes de la matriz, cuya expresión se encuentra reducida en la progresión de diferentes tumores (Lopez et al., 2005). Los miRNA, miR-373 y miR-520c estimulan la migración e invasión de células de cáncer de mama mediante la supresión de la expresión de CD44. También el miR-21 promueve los procesos de invasión y metástasis, mediante el reconocimiento y la inhibición de múltiples genes supresores de tumor (Huang et al., 2008).

miRNAs	Blanco asociado	Función del miRNA en metástasis de tumor
miR-10b	HOXD10	Promotor
miR-21	PTEN, PDCD4, TPM1, Maspin	Promotor
miR-373	CD44, LATS2	Promotor
miR-520c	CD44	Promotor
miR-155	RhoA	Promotor
Let-7	Ras, HMGA2	Represor
miR-335	SOX4, TNC	Represor
miR-126	Crk, IRS-1	Represor
miR-146a	ROCK1	Represor
miR-101	EZH2	Represor
Familia miR-200	ZEB1, ZEB2	Represor

Tabla 2. Papel de los miRNAs en metástasis. Se enlistan diversos miRNAs con su respectivo gen blanco y se describe si su acción es como promotor a represor de metástasis (Adaptado de Kai Ruan et al., 2009).

En contraste, también se ha determinado que algunos miRNAs parecen llevar a cabo un papel como supresores de metástasis, la mayoría de estos estudios se han realizado en células de cáncer mamario. Dentro de este grupo de miRNAs encontramos miR-126, miR-206 y miR-335, la expresión de éstos está relacionada con una disminución del riesgo de recaída metastásica. En concreto, miR-335 ejerce su función mediante la regulación del factor de transcripción SOX4, el cual regula el desarrollo celular y la migración (Tavazoie et al., 2008; Romero et al., 2012).

La primera evidencia directa de la participación de los miRNAs en el desarrollo tumoral cáncer fue publicada por Calin et al., en el 2002. Durante el estudio de una delección en el cromosoma 13, la cual se presenta frecuentemente en la leucemia linfocítica crónica, encontraron 2 genes de miRNAs que mapeaban dentro del segmento incluido en esta delección de 30kb: el miR-15 y miR-16. Al evaluar las muestras de sangre de estos pacientes con LLC encontraron que los dos miRNAs se encontraban ausentes o al menos significativamente disminuidos en el 68% de los casos. Este hallazgo sugirió que se encontraban causalmente involucrados en la patogénesis de la LLC. Poco después el mismo grupo identificó que el 50% de los genes de miRNAs se ubican en regiones genómicas asociadas con cáncer, como sitios frágiles, regiones de pérdida de heterocigosidad mínima, en genes HOX, regiones de mínima amplificación y regiones comunes de ruptura (Calin et al., 2004).

A continuación vamos a centrarnos en el cáncer de mama, ya que es el tumor más estudiado en relación con los miRNAs, para explicar el papel de éstos en este proceso. Los miRNAs juegan un rol en la fisiología normal de la mama; así, en un estudio realizado en 2009 por Avril-Sassen se examinó la expresión de miRNAs en la glándula mamaria de ratones en edad juvenil y adulta, evaluando diferentes etapas como el embarazo, lactancia e involución de la glándula (Avril-Sassen et al., 2009). Se encontró que los miRNAs se expresan en 7 grupos co-regulados durante distintas fases del ciclo de la glándula. Varios miRNAs que se habían asociado con cáncer de mama se encuentran sobreexpresados durante la pubertad y la gestación, como miR-25 y miR-17-92, lo que sugiere que pueden formar parte de un programa fisiológico de proliferación y también incidir en el crecimiento generado por tumores. Además, los miRNAs relacionados con el fenotipo diferenciado final como Let-7 también aumentan durante la pubertad y la gestación. Otra de estas moléculas, miR-29 por su parte aumenta su expresión durante la involución causada por la post-lactancia, con una reducción en la expresión de sus mRNAs diana, lo que sugiere un papel en la remodelación de la glándula.

Actualmente se está tratando de identificar con precisión cuales son las dianas de los miRNAs con el fin de conocer las diferentes redes de señalización sobre las cuales inciden éstos, lo que nos servirá para conocer si regulan una sola diana o varias simultáneamente (Kim et al., 2012).

Gracias al conocimiento sobre la participación de los miRNAs en la iniciación, progresión y metástasis tumoral, y al descubrimiento de muchos miRNAs que ejercen efectos supresores de tumor, se espera que estos pequeños nucleótidos emerjan como una opción terapéutica eficaz para el tratamiento del cáncer mediante la restauración de su expresión en la esperanza de que de esta manera se puedan obtener efectos terapéuticos (Romero et al., 2012).

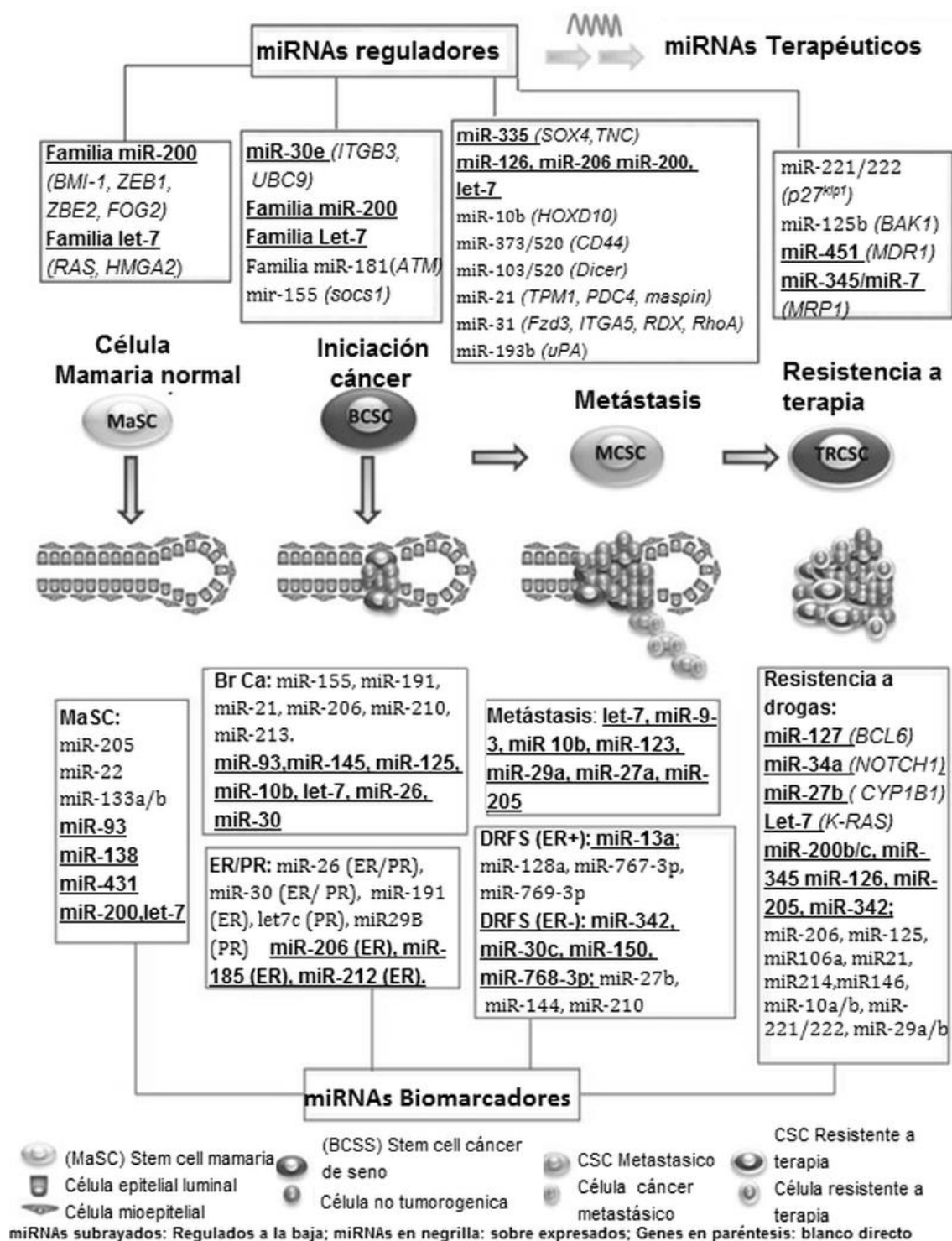


Figura 12. Un resumen de los reguladores y los biomarcadores miRNA en el desarrollo de la glándula mamaria normal, la iniciación del cáncer de seno, la metástasis y la resistencia a la terapia. En estos cuatro procesos, las células madre mamarias (MaSC), células madre del cáncer de mama (BCSCs), CSC metastásicos (MCSCs) y células madre cancerosas resistentes a la terapia (TRCSCs) son creadores fundamentales y/o jugadores celulares críticos. La lista de los miRNA reguladores del panel superior, incluye los miRNAs

supresores y oncomiRs que se muestran subrayados en la figura, presentes en el desarrollo normal de la glándula mamaria (originado - MASCs), la iniciación de cáncer de mama (mediada por BCSCs), la metástasis del cáncer de mama, y resistencia a la terapia, respectivamente (Tomado de Liu Huiping, 2012).

Además de su relación con el cáncer de mama, se han realizado diversos estudios en otro tipo de tumores, como por ejemplo el cáncer de cérvix, el cual es el cuarto más común en mujer y que causa un 7,5% de las muertes por cáncer en mujeres. En 2010 se estudió la expresión de miRNA en tejidos cervicales humanos, tanto cancerosos como normales, encontrándose diferencias notables en dicha expresión. (Pereira et al., 2009) Dentro de estos miRNAs se identificó a miR-218 el cual juega un papel importante en la diferenciación hacia malignidad.

Dentro del sarcoma, que es un grupo heterogéneo de tumores poco frecuentes con una supervivencia muy baja y con una alta frecuencia de formación de metástasis a distancia, también se ha establecido un papel de los miRNAs, como miR-138, miR-132, miR-143, entre otros, los cuales juegan un papel importante en su diseminación y podrían tener un papel importante como factor pronóstico de la enfermedad (Wong et al., 2015).

Por último, en el carcinoma nasofaríngeo, que es un tumor epitelial maligno de cabeza y cuello muy predominante en el sudeste asiático y con un buen pronóstico si es diagnosticado en estadios tempranos de la enfermedad se han identificado hasta 734 miRNAs relacionados.

Perspectivas futuras

Teniendo en cuenta las limitaciones de las actuales pruebas de detección de cáncer, el uso de miRNAs como marcadores tumorales para el diagnóstico y el pronóstico ha despertado interés en clínica, aunque se hacen necesarias más investigaciones que evalúen los efectos de los miRNAs mediante ensayos clínicos que permitan optimizar la interacción de los miRNAs con sus mRNAs diana, tratando de mejorar la eficacia y estabilidad de los mismos. El interés en los miRNAs es ahora mayor que nunca y la literatura se está nutriendo rápidamente con un gran número de publicaciones recientes sobre los nuevos miRNAs, sus genes diana y el desarrollo de productos terapéuticos basados en ellos.

Mediante técnicas de Microarrays de miRNAs se puede evaluar simultáneamente la expresión de varios cientos de genes en la misma muestra a la misma vez, mientras que sólo se requiere de pequeñas cantidades de RNA total como punto de partida para el ensayo (Yin et al., 2008). Estas tecnologías nos pueden ayudar a identificar potenciales miRNAs supresores tumorales y oncogénicos, y también a proporcionar una comprensión más completa de sus vías y los mecanismos que los relacionan con cáncer, células madre, metástasis y sensibilidad a fármacos. Los miRNAs pueden complementar otros biomarcadores genómicos y proteómicos para el diagnóstico y pronóstico del cáncer (Cho WC, 2007) teniendo en cuenta que cada miRNA puede controlar la expresión de cientos de genes diana.

Aunque el desarrollo reciente de medios farmacológicos más eficaces para modular las actividades de los miRNAs proporciona nuevas oportunidades terapéuticas, como la

introducción de oligonucleótidos antisentido para reducir la expresión de miRNAs que pueden provocar efectos no deseables (Kota et al., 2009). Un ejemplo de ello es el estudio publicado por Kim et al., en el 2011, donde mediante el uso de vectores virales consiguieron demostrar el efecto antitumoral del miR-145 en células epiteliales malignas mamarias, hecho que abre el camino hacia el uso de miR-145 como terapia antitumoral para el tratamiento de pacientes que han sido diagnosticados de cáncer de mama. Adicionalmente, en otro estudio se demuestra que un agregado exógeno de un tipo de miRNA (miR-141) tiene un ritmo más lento de degradación y permanecía detectable por períodos más largos en placenta, lo que sugiere que los miRNAs tienen una mayor estabilidad que los mRNA incluso en ausencia de protección y estando expuestos a la actividad nucleasa presente en el plasma, hechos que podrían potenciarse (por ejemplo, a través de asociación con partículas) (Chim et al., 2008).

Melatonina y miRNAs

En la última parte de esta memoria nos hemos propuesto revisar el conocimiento actual acerca de la interrelación entre estos dos tipos de moléculas, tras haber explicado, en el primer bloque, las funciones de la melatonina, entre ellas encontramos su clásica acción de regulador de los ritmos circadianos, la inmunomodulación, función antioxidante y un importante papel en diferentes tipos de cáncer donde a través de varios mecanismos como el control de la apoptosis, del ciclo celular o la angiogénesis actuará como supresor tumoral. Por otro lado, en la segunda parte de este trabajo hemos definido y descrito los miRNAs, que son una clase de RNA no codificante con una longitud de 19 a 25 nucleótidos que se encargan fundamentalmente de degradar o inhibir al RNAm, por lo que lógicamente tienen múltiples funciones reguladoras, tanto en procesos fisiológicas como patológicas. En el caso concreto del cáncer, se ha encontrado que muchos miRNAs actúan como genes supresores de tumores mientras que otros son capaces de promover diversas etapas del desarrollo tumoral, por lo que son conocidos como oncomiRNAs.

Es importante mencionar que el conocimiento acerca de la relación entre la melatonina y el cáncer está aún en etapas tempranas, baste mencionar que en este año 2019 sólo podemos encontrar 60 artículos al utilizar como criterio de búsqueda “melatonina + cáncer” de los cuales 47 son del año 2016 en adelante, si además a estas palabras clave añadimos además la palabra “cáncer” encontramos 14 artículos, 10 de ellos de los últimos tres años. Estos datos nos hacen observar lo poco desarrollado que está el conocimiento al respecto de este tema y del cual se espera una ampliación importante en los años venideros.

Como hemos comentado previamente los RNAs no codificantes contribuyen a la regulación de la expresión génica en las células de mamíferos, por lo tanto, no era descabellado predecir que también podrían modular la propia síntesis de melatonina. Efectivamente, dentro de este grupo encontramos diversos miRNAs como miR-183 que interfiere con la expresión del gen AANAT2, que codifica para una de las enzimas fundamentales en la síntesis de melatonina (Ben-Moshe Z et al., 2014). Otro ejemplo es miR-325-3p, que ejercerá la misma función pero de forma negativa en pacientes que han sufrido hipoxia-isquemia en el tejido cerebral (Yang Y et al., 2017). Además de estos dos miRNAs cuya función reguladora sobre la síntesis de melatonina ha sido bien establecida, se han

encontrado otros miRNAs que interactúan con la síntesis de esta indolamina, como por ejemplo miR-7, miR-483 o miR-451 los cuales también actúan regulando los niveles de AANAT2.

Por otra parte, es frecuente encontrar la situación inversa, es decir, la melatonina es capaz de regular algunos RNAs no codificantes, en concreto de los miRNAs, tanto incrementando como inhibiendo sus niveles.

Podemos encontrar diversas enfermedades y situaciones biológicas donde interactúan estas dos clases de moléculas:

- Enfermedades mentales y homeostasis cerebral: tomando como punto de partida el hecho de que la principal secreción de melatonina se produce en la glándula pineal, parece lógico considerar la posibilidad de que la hormona pineal realice diversas acciones a este nivel, participando de forma relevante en la patología y fisiología cerebral. Como ya se ha citado anteriormente, miR-483 regula la síntesis de aralkylamina N-acetiltransferasa (AANAT), una enzima fundamental en la formación de melatonina en la glándula pineal (Clokier SJ et al., 2012). Se ha demostrado que la transfección de pinealocitos con antagonistas de miR-483 resulta en un incremento de la síntesis de melatonina. Por otro lado, miR-325-3p ha sido identificado como un supresor de la producción de melatonina mediante la inhibición de la expresión de AANAT en situaciones de hipoxia-isquemia cerebral. (Yang Y et al., 2017)) Esta relación nos explica la conexión entre la alteración del ritmo circadiano neonatal y el daño cerebral.

En relación con el daño provocado por la hipoxia-isquemia cerebral, la melatonina parece desempeñar un papel protector debido a que posee propiedades antiinflamatorias sobre el sistema nervioso central y tejidos periféricos (Gianoulia-Karantana A et al, 2006; Esposito E, Cuzzocrea S, 2010). El principal mecanismo para llevar a cabo esta función parece ser inhibiendo las acciones de los lipopolisacáridos que producen inflamación en el tejido cerebral. El miR-34a ejerce la misma acción sobre los lipopolisacáridos, además de participar en las situaciones de estrés del retículo endoplasmático y la autofagia. Esta similitud en las acciones ha permitido postular que ambas moléculas podrían regular vías comunes en la respuesta antiinflamatoria cerebral. (Frankel LB, Lund AH, 2012; Jiang P et al., 2012).

Por otra parte, en lo que se refiere a los trastornos del espectro autista, es conocido que esta enfermedad neurológica y del desarrollo se caracteriza por la dificultad en la comunicación, la presencia de estereotipias y la abulia. Además de poseer una amplia base genética (Bourgeron T, 2015), se han observado diversas alteraciones bioquímicas: neuroquímicas, inmunológicas y metabólicas (Lam KS et al., 2006). Entre otros muchos efectos, ha quedado demostrado que en el trastorno autista se puede producir una reducción en los niveles de melatonina (Pagan C et al., 2014; Melke J et al., 2008). En un estudio reciente, se ha propuesto la relación entre los bajos niveles de melatonina con la supresión de AANAT por parte de miR-451 (Pagan C et al., 2017).

También se ha establecido relación entre los miRNAs y la melatonina con la enfermedad de Alzheimer, la cual como sabemos en la actualidad no tiene cura ni un tratamiento con una alta eficacia lo que ha llevado a realizar importantes esfuerzos en la búsqueda de agentes terapéuticos efectivos. En el artículo de Meng F et al., del año 2013 se propone la asociación de diversos fármacos como quinostatina o amantadina con diferentes miRNAs como por ejemplo miR-148b o miR-15a o la posibilidad de considerar la administración de melatonina y el miR-30e-5p como posibles estrategias futuras en el tratamiento del Alzheimer. Esta última asociación estaría encaminada a reducir la expresión de diversos genes implicados en esta enfermedad (Meng F et al., 2013).

Por último, dentro de este grupo de enfermedades que afectan al sistema nervioso central encontramos la enfermedad de Huntington, la cual se caracteriza por presentar multitud de movimientos involuntarios, como coreas, balismos o hemibalismos lo que evidentemente empobrece la calidad de vida del paciente. Los tratamientos empleados en esta patología incluyen habitualmente antipsicóticos, antidepresivos, estabilizadores del ánimo o ansiolíticos. En un estudio del año 2013 se propone un papel para el miR-222, molécula que parece ser modificada por diversos fármacos, interfiriendo de esta manera con la regulación de la huntingtina, la proteína clave alterada desencadenante de esta enfermedad (Lauterbach EC, 2013).

- Hepatopatías: diferentes investigaciones han explicado las propiedades protectoras que ejerce la melatonina en diversas enfermedades hepáticas, como la colestasis, cirrosis hepática, hígado graso, fibrosis, cirrosis y hepatocarcinoma (Zhang JJ et al., 2017). Se ha demostrado que la administración de melatonina tiene efectos terapéuticos en la fibrosis hepática de ratones modificados mediante bioingeniería a través de la regulación negativa de miR-200b (Wu N et al., 2017). El hecho de que los niveles de este miRNA estén elevados en estos ratones nos indica la posible utilidad de la melatonina en fibrosis hepática y daño biliar en colangiopatías. De forma similar, en otro estudio, se relacionó el daño hepático debido al alcohol con niveles anormalmente altos de miR-497, que se encarga de interactuar con el receptor cannabinoide tipo 1 (Kim YD et al., 2017). Además, se ha establecido la relación entre la melatonina, miR-23a y la esteatosis hepática. Este miRNA se encarga de aumentar el estrés sobre el retículo endoplasmático produciendo así la esteatosis mientras que la melatonina se encarga de regular negativamente a dicho miRNA (Kim SK et al., 2015).
- Enfermedades Cardiovasculares: dentro de este grupo encontramos la aterosclerosis, este proceso multifactorial está a menudo iniciado por una disfunción endotelial y apoptosis (Gimbrone MA, Garcia-Cardena G, 2016). Una dieta rica en grasas incrementa la permeabilidad endotelial y la apoptosis (Hu ZP et al., 2013), lo cual se asocia con el desarrollo de aterosclerosis (Weintraub WS, 2002). En una investigación, donde se usaron ratones modificados genéticamente para que presentaran aterosclerosis, se ha establecido una relación entre una dieta rica en grasas y la expresión de miR-29 (Zhu HQ et al., 2014). Investigaciones posteriores mostraron la conexión entre miR-29b y el receptor de melatonina MT1. Por otro lado, la melatonina se considera un cardioprotector ya

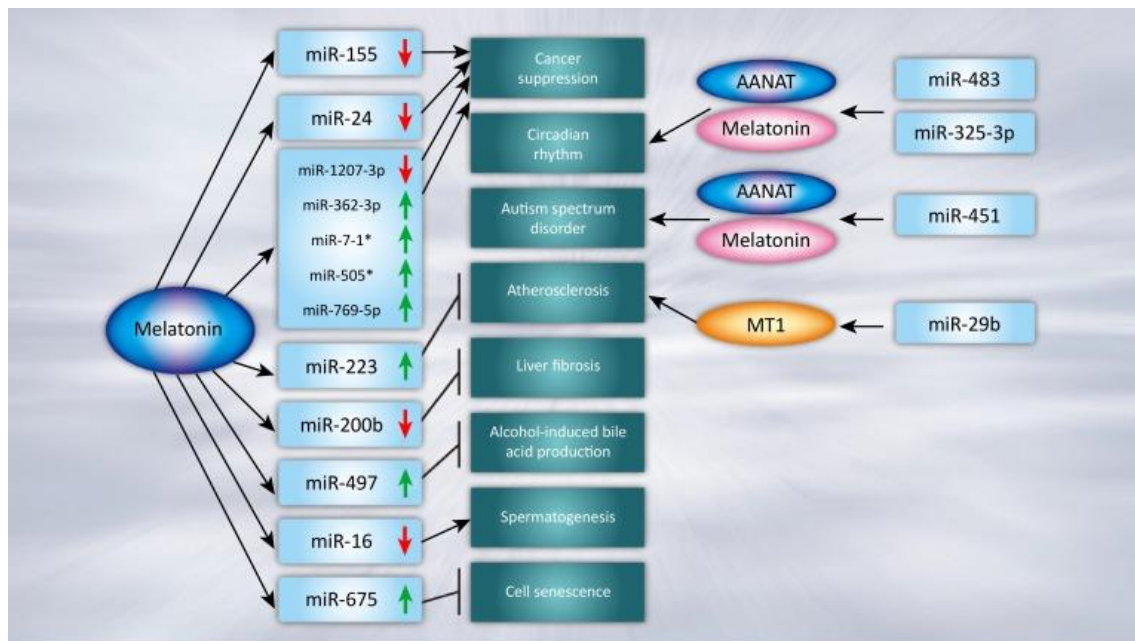
que atenúa el daño molecular y celular resultante de la isquemia-reperfusión cardíaca (Reiter RJ et al., 2010). Todos estos resultados demostrando la relación entre miR-29b y MT1 prueban el efecto que tiene este miRNA en la regulación de esta molécula.

Los miRNAs y la melatonina también juegan un papel importante en las arritmias cardíacas malignas, como la fibrilación ventricular. La suplementación con melatonina (40 picogramos/ml/día) reduce la expresión de miR-30a el cual a su vez regula a la proteína connexin-43, una proteína necesaria para la correcta disposición de las GAP-junctions que juega un papel importante en dichas arritmias ventriculares (Egan-Beganova T et al., 2019).

Respecto a la hipertensión pulmonar, se ha descrito que la expresión de miR-200a y la de miR-675, aumentadas en este proceso, se ve reducida tras la suplementación con melatonina mediante la regulación de H19 (Wang R et al., 2018).

Por último, un estudio del año 2018 afirma que la melatonina ejerce su acción en infartos de miocardio con fracción de eyección conservada mediante la inhibición de la apoptosis de los cardiomiocitos. Esta acción parece ser llevada a cabo a través de la regulación de miR-200a (Liu Y et al., 2018).

- Espermatogénesis: la melatonina también juega un papel importante en la espermatogénesis y la reproducción animal (Reiter RJ et al, 2013). La administración de melatonina aumenta el desarrollo testicular y la calidad del semen en cabras (Ramadan TA et al., 2009; Casao A et al., 2010). En cuanto a la interacción de la melatonina y los miRNAs, se ha descrito que miR16 se encuentra regulado negativamente en respuesta al tratamiento con melatonina promoviéndose así el crecimiento celular y reduciéndose la apoptosis. (Li C et al., 2016)
- Inmunomodulación: como hemos explicado previamente la melatonina ejerce funciones antioxidantes, antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Respecto a la artritis reumatoide se ha establecido que lleva a cabo su acción mediante la inhibición de TNF-alfa y IL-1beta a través del aumento de la expresión de miR-3150a-3p, además de la regulación ya conocida sobre PI3K/AKT, ERK y NF-kB (Huang CC et al., 2019). Por último, respecto a la fragilidad asociada a la edad, se ha establecido la conexión entre tres miRNAs relacionados con la inflamación (miR-21, miR-146a y miR-223) y otro que como ya hemos descrito, participa en el control de la síntesis de la melatonina (miR-483). La alta expresión de estos miRNAs parece ir acompañada de un aumento del ratio TNFalfa/IL-10 (Rusanova I et al., 2018),



Trends in Endocrinology & Metabolism

Figura 13. Interacciones funcionales entre la melatonina y miRNAs (Imagen tomada de Shih-Chi S et al., 2018).

Melatonina, miRNA y cáncer

En el último apartado de esta memoria, vamos a revisar el conocimiento existente acerca de la relación entre la melatonina, la expresión de diverso miRNAs y el cáncer. Ha quedado demostrado en diversos estudios, tanto *in vivo* como *in vitro* la función que ejerce la melatonina sobre el crecimiento de diversos tipos de cáncer y sobre la metástasis tumoral (Su Sc et al., 2017; Reiter RJ et al., 2017). La melatonina parece llevar a cabo sus acciones antitumorales mediante diversos mecanismos de acción como la inhibición de la proliferación celular y de la angiogénesis, la modulación del ciclo celular, o el control de la invasión y de las metástasis.

Esta variedad de mecanismos subyacentes a las acciones de la melatonina para antagonizar el crecimiento e invasión tumoral implican la expresión diferencial de los genes codificantes de proteínas. Está empezando a describirse que los miRNAs, que como ya sabemos pueden ser tanto promotores como supresores tumorales, pueden ver alterados sus niveles en respuesta a la señalización de melatonina. Se ha podido identificar el papel que juegan estas moléculas en diferentes tipos de tumores malignos, aun así, sigue siendo un campo prácticamente sin explorar y con amplias posibilidades futuras, tanto diagnósticas como terapéuticas.

La melatonina además de poseer funciones antitumorales como las que hemos citado anteriormente, también parece ejercer una acción preventiva frente al cáncer. Esta afirmación se desprende de estudios como el de Gil-Martin E et al., de 2019 en el que se indica que previene la diferenciación tumoral en células colorrectales (Gil-Martin E et al., 2019). Esta misma acción protectora la podemos encontrar en células pulmonares a través de la regulación de miR-30e (Wu X et al., 2019) o en la neurotoxicidad a través del miR-132 (Zhao Y et al., 2018).

La melatonina es capaz de inhibir el crecimiento de las células de glioma (Martin V et al., 2006), además de mejorar la eficacia de diversos compuestos oncostáticos en glioblastoma a través de la regulación epigenética de la expresión de ABCG2, que codifica para una bomba que expulsa los compuestos quimioterapéuticos reduciendo así su eficacia (Martin V et al. 2013). Recientemente, se ha establecido la relación entre un miR-155 (un miRNA oncogénico), y la melatonina. Se ha demostrado la regulación negativa que ejerce la indolamina sobre este miRNA a través de la represión de c-MYC, un oncogén con función de activador transcripcional, disminuyendo así la proliferación e invasión celular (Gu J et al., 2017).

Por otro lado, un estudio realizado en 2018 ha demostrado que en líneas celulares derivadas de hepatocarcinoma humano (Huh7 y HepG2) tratadas con concentraciones de melatonina de 1 y 2mM disminuye la proliferación, migración e invasión. Este efecto beneficioso de la hormona pineal parece estar relacionado con la inducción de la expresión del miRNA let7i-3p, el cual reduce drásticamente la expresión de RAF1 (Wang TH et al., 2018).

Por último, la melatonina también ha demostrado su función en la inhibición de la proliferación celular en cáncer gástrico estimulando la expresión de miR-16-5p, el cual regula negativamente a Smad3, gen relacionado con el crecimiento celular, la apoptosis y la diferenciación celular. (Zhu C et al., 2018).

En cáncer de mama se han podido identificar 22 miRNAs cuya expresión se ve alterada por la inclusión de dosis fisiológicas de melatonina en el cultivo celular. La expresión de estos miRNAs se correlaciona de manera inversa con los niveles de varios mRNAs implicados en la supresión de la proliferación tumoral (Lee SE et al., 2011) Estos genes codificantes para proteínas que se encuentran regulados por miRNAs tienen relación con el ciclo celular, la translocación de fosfolípidos, la biosíntesis de lípidos y la quimiotaxis. La manipulación de la expresión de dos de estos miRNAs regulados por la hormona pineal, miR-363-3p y miR-1207-3p, ha permitido determinar la relevancia funcional de estos miRNAs en la relación entre la melatonina y el cáncer (Lee SE et al., 2011). Por otro lado, otra investigación ha identificado que miR-24 desciende sus niveles tras un tratamiento de 72 horas con melatonina debido a la reducción de los niveles de hnRNP A1, factor implicado, entre otras funciones, en el mantenimiento de los telómeros (Mori F et al., 2016). Este hecho ha permitido identificar otra de las funciones oncostáticas de la melatonina, ya que la sobreexpresión de miR-24 promueve el daño al DNA dependiente de p38 y p53 en células de cáncer de mama, lo que conduce a las mismas a la apoptosis. De estas investigaciones se establece que diferentes concentraciones y duración del tratamiento con melatonina tienen diferentes impactos en la expresión de miRNAs. Esta regulación negativa de miR-24 la podemos encontrar también en cáncer de colon, cabeza y cuello, además del ya nombrado de mama.

Para finalizar, me gustaría añadir una comunicación personal con mi Director del Trabajo de Fin de Grado, Carlos Martínez Campa. En un trabajo pendiente de publicación en el momento actual se ha establecido una relación entre la melatonina y algunos miRNAs en células de cáncer de mama. En este trabajo se ha encontrado que el tratamiento con doxorubicina tiene un efecto estimulador muy potente sobre la expresión del factor de transcripción TWIST1, implicado en la transición epitelio-mesenquimal, lo que a su vez

eleva los niveles de miR-10b. Cuando además de doxorubicina se administra melatonina, los niveles de TWIST1 y de miR10-b disminuyen de forma drástica (Menéndez-Menéndez J et al., 2019).

Conclusiones

La melatonina se encarga de regular diversos procesos como la división celular, la apoptosis, la angiogénesis o la inmunomodulación, además de su papel más característico de sincronizador de los ritmos circadianos. Estas funciones son llevadas a cabo mediante diversos mecanismos moleculares. Algunos de estos mecanismos implican una relación bidireccional con los miRNAs, que son pequeñas moléculas de aproximadamente 22 nucleótidos que se encargan de silenciar o inhibir a diversos RNA mensajeros de una manera específica, con efectos a diversos niveles como a nivel metabólico o tumoral. Esta relación consiste en que la melatonina es capaz de regular la expresión de diferentes miRNAs lo que juega un papel clave en multitud de entidades fisiológicas y patológicas, como en varias enfermedades cerebrales/mentales (autismo, Alzheimer, Huntington...), cardiovasculares, o procesos fisiológicos como la espermatogénesis. Como hemos comentado, la relación es bidireccional por lo que diversos miRNAs también controlan la síntesis de melatonina.

Además de esta amplia relación, tanto la melatonina como los miRNAs parecen jugar un papel importante en multitud de procesos tumorales, como puede ser el cáncer gástrico, hepático, prostático, o el que actualmente cuenta con un mayor número de estudios que es el cáncer de mama.

Para finalizar me gustaría resaltar la actualidad del tema que hemos tratado, ya que el número de publicaciones en las que melatonina y miRNAs han sido relacionadas es escaso (60 en el momento actual), la mayor parte de ellos publicados en los últimos tres años. Por lo tanto parece fácil especular que el crecimiento en este campo del conocimiento va a ser muy amplio en los próximos años.

Bibliografía

- Acuna-Castroviejo, D.; Escames, G.; Venegas, C.; Diaz-Casado, M.E.; Lima-Cabello, E.; Lopez, L.C.; Rosales-Corral, S.; Tan, D.X.; Reiter, R.J. Extrapineal melatonin: Sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol. Life Sci.* 2014, 71, 2997–3025
- Acunzo J. MicroRNA in Cancer and Cachexia. *J Infect Dis.* 2015 Jul 15; 212(Suppl 1): S74–S77.
- Álvarez-García V, González A, Alonso-Gonzalez C, Martínez-Campa C, Cos S. (2013). Antiangiogenic effects of melatonin in endothelial cell cultures. *Microvascular-Research.* 87:25-33
- American Cancer Society , “Cancer facts and Figures”, 2017, May 2018, <http://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2017.html>
- Ames N, Shigenaga MK, Tory M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging (cancer/mutation/endogenous DNA adducts/oxygen radicals). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1003, 90:7915-7922.
- Benítez-King G, Soto-Vega E, Ramírez-Rodríguez G. Melatonin modulates microfilament phenotypes in epithelial cells: implications for adhesion and inhibition of cancer cell migration. *Histol Histopathol.* Jun 2009, 24(6): 789-799
- Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ *Nat Genet.* 2003 Nov; 35(3):215-7.
- Bernstein E., Caudy AA., Hammond SM., Hannon GJ. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363–366.
- Biocancer Research journal [internet]. ISSN 1697-6452. C2010. Angiogenesis tumoral [citado en 2004]. Disponible en: <http://www.biocancer.com/journal/264/2-angiogenesis.tumoral>.
- Blalock JE, Smith EM. Conceptual development of the immune system as a sixth sense. *Brain behav. Immun* 2007, 21, 23-33
- Blask DE, Sauer LA, Dauchy RT. Melatonin as chronobiotic/anticancer agent: cellular, biochemical and molecular mechanisms of action and their implications for circadian-based cancer therapy. *Bentham science*, 2002; 2:113-132
- Blask DE. (1993). Melatonin in Oncology. En: Yu HS, Reiter RJ, editores. *Melatonin. Biosynthesis, physiological effects, and clinical applications.* Boca Ratón: CRC Press; 447-475.
- Bourgeron T. From the genetic architecture to synaptic plasticity in autism spectrum disorder. *Nat Rev Neurosci.* 2015, 15, 551-563
- Cardinali DP, Jordá Catalá J, Sánchez-Barceló E. Introducción a la cronobiología: fisiología de los ritmos biológicos, 1994, 3:48-49
- Carrillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez-Sanchez N, Rodriguez-Rodriguez A, Guerrero Jm. Melatonin: buffering the Immune system. *Int.J.Mol.Sci.* 2013, 14(4), 8638-8683

Casao A, Vega S, Palacín I, Pérez-Pe R, Laviña A, Quintín FJ, Sevilla E, Abecia JA, Cebrián-Pérez JA, Forcada F, Muiño-Blanco T. Effects of melatonin implants during non-breeding season on sperm motility and reproductive parameters in Rasa Aragonesa rams. *Reprod Domest Anim.* 2010, 45, 425-432

Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature.* 2010 Jun 3; 465(7298):584-9.

Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R *Nature.* 2005 Aug 4; 436(7051):740-4

Cho WC. 2007. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer.* 6(1):60.

Clokier SJ, Lau P, Kim HH, Coon SL, Klein DC. MicroRNAs in the pineal gland: miR-483 regulates melatonin synthesis by targeting anilalkylamine N-acetyltransferase. *J.Biol.Chem.* 2012. 287, 25312-25324

Coller HA, Forman JJ, Lefesse-Miller A. Myc ed messages: Myc induces transcription of E2F1 while inhibiting its translation via microRNA polycistron. *PLoS Genet* 2007; 3: e146

Cos S, Fernandez R, Güezmes A, Sánchez-Barceló EJ. Influence of melatonin on invasive and metastatic properties of MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Research.* Oct 1998, 58(19): 4383-4390

Cos S, González A, Martínez-Campa C, Mediavilla MD, Alonso-González C, Sánchez-Barceló EJ. Melatonin as a selective estrogen enzyme modulator. *Curr Cancer Drug Targets.* Dec 2008, 8(8):691-702. Review

Culler BR. Herpesvirus microRNAs: phenotypes and functions. *Curr Opin Virol.* 2011 Sep; 1(3):211-5

D. González, I. Bejarano, C. Barriga, A.B. Rodríguez, J.A. Pariente (2010). "Oxidative Stress-Induced Caspases are Regulated in Human Myeloid HL-60 Cells by Calcium Signal". *Current Signal Transduction Therapy* 5: 181-186. doi:[10.2174/157436210791112172]

Debeljuk L, Feder VM, Paulacci AO. "Effects of melatonin on changes induced by castration and testosterone in sexual structures of male rats". *Endocrinology*, vol. 87, no. 6, pp. 1358-1360, 1971.

Dun-Xian T, Lucien CM, Eduardo Esteban-Zubero, Zhou Zhou, Russell JR: Melatonin as a Potent and Inducible Endogenous Antioxidant: Synthesis and Metabolism. *Molecules* 20(10), 18886-18906. 2015

Egan Benova T, Vicenczova C, Szeiffova Bacova B, Knezl V, Dosenko V, Rauchova H, Zeman M, Reiter RJ, Tribulova N. Obesity-associated alterations in cardiac connexin-43 and PKC signaling are attenuated by melatonin and omega-3 fatty acids in female rats. *Mol Cell Biochem.* Apr 2019, 454(1-2):191-202

Fernández-Hernando C, Ramírez CM, Goedeke L, Suárez Y. MicroRNAs in metabolic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Feb; 33(2):178-85.

Filipowicz, Witold, Bhattacharyya, Suvendra N., Sonenberg, Nahum. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 9:102-114.

Frankel LB, Lund AH. MicroRNA regulation of autophagy. *Carcinogenesis.* 2012, 33, 2018-2025

Frankel LB., Christoffersen NR., Jacobsen A., Lindow M., Krogh A., Lund AH. 2008. Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J Biol Chem.* 283:1026–1033.

Frost RJ, Olson EN. Control of glucose homeostasis and insulin sensitivity by the Let-7 family of microRNAs *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Dec 27; 108(52):21075-80.

Fuster V, Ross R, Topol EJ. Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Página 434. (books.google.es)

Giannoulia-Karantan A, Vlachou A, Polychronopoulou S, Papassotiriou I, Chrousos GP. Melatonin and immunomodulation: connections and potential clinical applications. *Neuroimmunomodulation.* 2006, 13, 133-134.

Gil-Martín E, Egea J, Reiter RJ, Romero A. The emergence of melatonin in oncology: Focus on colorectal cancer. *Med Res Rev.* Apr 2019, doi: 10.1002/med.21582 [Epub].

Gimbrone MA, Garcia-Cardena G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res.* 2016, 118, 620-636.

Givertz MM. Role of oxidative stress in heart failure. Literature review current through. [Internet]. 2015. Disponible en: <http://www.uptodate.com/contents/role-of-oxidative-stress-in-heart-failure?source=preview&search=estr%C3%A9s+oxidativo&language=en-US&anchored=H1&selectedTitle=1150#H27963092>

González A, Martínez-Campa C, Alonso-González C, Cos S. Melatonin affects the dynamic steady-state equilibrium of estrogen sulfates in human umbilical vein endothelial cells by regulating the balance between estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Int J Mol Med.* Dec 2015, 36(6):1671-1676

González D., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. (2014). "TNF α -induced apoptosis in human myeloid cell lines HL-60 and K562 is dependent of intracellular ROS generation". *Molecular and Cellular Biochemistry* 390: 281-287.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 2006 Jan 1; 34(Database issue):D140-4.

Griggs EM, Young EJ, Rumbaugh G, Miller CAJ. MicroRNA-182 regulates amygdala-dependent memory formation. *Neurosci.* 2013 Jan 23; 33(4):1734-40.

Gu J, Lu Z, Ji C, Chen Y, Liu Y, Lei Z, Wang L, Zhang HT, Li X. Melatonin inhibits proliferation and invasion via repression of miRNA-155 in glioma cells. *Biomed Pharmacother.* Sep 2017, 93:969-975

Hojjman E, Rocha Viegas L, Keller Sarmiento MMI, Rosenstein RE, Pecci A. Involvement of Bax protein in the prevention of glucocorticoid-induced thymocytes apoptosis by melatonin. *Endocrinology* 2004, 145:418-425

Horvitz HR, Sulston JE Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1980 Oct; 96(2):435-54

Hsu SH, Wang B, Kota J, Yu J, Costinean S, Kutay H, Yu L, Bai S, La Perle K, Chivukula RR, Mao H, Wei M, Clark KR, Mendell JR, Caligiuri MA, Jacob ST, Mendell JT, Ghoshal K J Essential metabolic, anti-inflammatory, and anti-tumorigenic functions of miR-122 in liver. *Clin Invest*. 2012 Aug; 122(8):2871-83.

Hu ZP, Fang XL, Fang N, Wang XB, Qian HY, Cao Z, Cheng Y, Wang BN, Wang Y. Melatonin ameliorates vascular endothelial dysfunction, inflammation, and atherosclerosis by suppressing the TLR4/NF- κ B system in high-fat-fed rabbits. *J Pineal Res*. 2013, 55, 388-398

Huang CC, Chiou CH, Liu SC, Hu SL, Su CM, Tsai CH, Tang CH. Melatonin attenuates TNF- α and IL-1 β expression in synovial fibroblasts and diminishes cartilage degradation: Implications for the treatment of rheumatoid arthritis. *J Pineal Res*. Apr 2019, 66(3):e12560

Jiang P, Liu R, Liu X, Chang L, Xiong S, Chu Y. MiR-34^a inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through targeting Notch1 in murine macrophages. *Exp. Cell Res*. 2012, 318, 1175-1184

Jordan, J. (2003). «Apoptosis: muerte celular programada». Centro Regional de Investigaciones Biomédicas. Consultado el 15 de noviembre de 2016.

Joseph D., Chong N.W., Shanks M.E., Rosato E., Taub N.A., Petersen S.A. Getting rhythm: how do babies do it? *Arch. Dis. Child. Fetal Neonatal Ed*. 2014;100(1):F50–F54. doi: 10.1136/archdischild-204-306104.

Kim SJ, Kang HS, Lee JH, Park JH, Jung CH, Bae JH, Oh BC, Song DK, Baek WK, Im SS. Melatonin ameliorates ER stress-mediated hepatic steatosis through miR-23a in the liver. *Biochem Biophys Res Commun*. Mar 2015, 13;458(3):462-469

Kym YD, Hwang SL, Lee EJ, Kim HM, Chung MJ, Elfadl AK, Lee SE, Nedumaran B, Harris RA, Jeong KS. Melatonin ameliorates alcohol-induced bile acid synthesis by enhancing miR-497 expression. *J Pineal Res*. 2017, 62, e12386

Lam KS, Aman MG, Arnold LE. Neurochemical correlates of autistic disorder: a review of the literature. *Res Dev Disabil*. 2006, 27, 254-289

Lauterbach EC. Neuroprotective effects of psychotropic drugs in Huntington's disease. *Int J Mol Sci*. Nov 2013, 15;14(11):22558-603

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843–854. [PubMed] [Google Scholar]

Lee SE, Kim SJ, Youn JP, Hwang SY, Park CS, Park YS. MicroRNA and gene expression analysis of melatonin-exposed human breast cancer cell lines indicating involvement of the anti-cancer effect. *J Pineal Res*. Oct 2011, 51(3), 345-352

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *VNEMBO J.* 2004 Oct 13; 23(20):4051-60

Leon J, Acuña-Castroviejo D, Sainz R, Mayo JC, Tan DX, Reiter RJ. Melatonin and mitochondrial function. *Life Sciences.* 2004 July; 7(75): 765-790

Leon-Blanco MM, Guerrero JM, Reiter RJ, Calvo JR, Pozo D. Melatonin inhibits telomerase activity in the MCF-7 tumor cell line both in vivo and in vitro. *J Pineal Res.* Oct 2003, 35(3):204-211

Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W: Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *J Ames Chem Soc* 80:2587, 1958

Li C, Chen S, Li H, Chen L, Zhao Y, Jiang Y, Liu Z, Liu Y, Gao S, Wang F, Yu J, Wang H, Rao J, Zhou X. MicroRNA-16 Modulates Melatonin-Induced Cell Growth in the Mouse-Derived Spermatogonia Cell Line GC-1 spg Cells by Targeting Ccnd1. *Biol Reprod.* 2016, 95, 57

Liu Y, Li LN, Guo S, Zhao XY, Liu YZ, Liang C, Tu S, Wang D, Li L, Dong JZ, Gao L, Yang HB. Melatonin improves cardiac function in a mouse model of heart failure with preserved ejection fraction. *Redox Biol.* Sep 2018, 18:211-221

Lozano G.M., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, A., García, J.F., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. (2009). "Density gradient capacitation is the most suitable method to improve fertilization and to reduce DNA fragmentation positive spermatozoa of infertile men". *Anatolian Journal of Obstetrics & Gynecology* 3(1): 1-7.

Lozano G.M., Bejarano, I., Espino, J., González, D., Ortiz, A., García, J.F., Rodríguez, A.B., Pariente, J.A. (2009). "Relationship between Caspase Activity and Apoptotic Markers in Human Sperm in Response to Hydrogen Peroxide and Progesterone". *Journal of Reproduction and Development* 55(6): 615-621.

Marelli MM, Limonta P, Maggi R, Motta M, Moretti RM, "Growth –inhibitory activity of melatonin on human androgen-independent DU 145 prostate cancer cells", *The prostate*, vol.45, no.3, pp. 238-244, 2000.

Martín V, Herrera F, Carrera-Gonzalez P, García-Santos G, Antolín I, Rodríguez-Blanco J, Rodríguez C. Intracellular signaling pathways involved in the cell growth inhibition of glioma cells by melatonin. *Cancer Res.* Jan 2006, 66(2):1081-1088

Martín V, Sanchez-Sanchez AM, Herrera F, Gomez-Manzano C, Fueyo J, Alvarez-Vega MA, Antolín I, Rodríguez C. Melatonin-induced methylation of the ABCG2/BCRP promotes as a novel mechanism to overcome multidrug resistance in brain tumour stem cells. *Br J Cancer.* May 2013, 108(10): 2005:2012

Martínez-Campa C, González A, Mediavilla MD, Alonso-González C, Alvarez-García V, Sánchez-Barceló EJ, Cos S. Melatonin inhibits aromatase promoter expression by regulating cyclooxygenases expression and activity in breast cancer cells. *Br J Cancer.* Nov 2009, 3, 101(9): 1613-9

Mediavilla MD, Sánchez-Barceló EJ, Tan DX, Manchester L, Reiter RJ. Basic mechanism involved in the anti-cancer effects of Melatonin. *Curr Med Chem* 2010; 17, 4462-4481.

Melke J, Goubran Botros H, Chaste P, Betancur C, Nygren G, Anckarsäter H, Rastam M, Ståhlberg O, Gillberg IC, Delorme R, Chabane N, Mouren-Simeoni MC, Fauchereau F, Durand CM, Chevalier F, Drouot X, Collet C, Launay JM, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T. Abnormal melatonin synthesis in autism spectrum disorders. *Mol Psychiatry*. 2008, 13, 90-98

Menéndez-Menéndez J, Alonso-González C, Hermida-Padro F, Gonzalez A, García-Pedrero JM, González-González A, Cos S, Martínez-Campa C. Deciphering the molecular basis of melatonin protective effects on breast cells treated with doxorubicin: TWIST1 a transcription factor involved in EMT and metastasis, a novel target of melatonin. *Cancers*. 2019, 11, x; doi: FOR PEER REVIEW

Menéndez-Menéndez J, Martínez-Campa C. Melatonin: An Anti-Tumor Agent in Hormone-Dependent Cancers. *Int J Endocrinol*. Oct 2018, 2;2018:3271948

Meng F, Dai E, Yu X, Zhang Y, Chen X, Liu X, Wang S, Wang L, Jiang W. Constructing and characterizing a bioactive small molecule and microRNA association network for Alzheimer's disease. *J R Soc Interface*. Dec 2013, 18;11(92):20131057

Mori F, Ferraiuolo M, Santoro R, Sacconi A, Goeman F, Pallocca M, Pulito C, Korita E, Fanciulli M, Muti P, Blandino G, Strano S. Multitargeting activity of miR-24 inhibits long-term melatonin anticancer effects. *Oncotarget*. Apr 2016, 7(15):20532-20548

Mucahit Emet, Halil Ozcan, Luftu Ozel, Muhammed Yayla, Zekai Halici, Ahmet Hacimuftuoglu. A review of Melatonin, its receptors and drugs. *Eurasian J Med*. 2016 Jun; 48(2):135-141

Nava M, Romero F, Quiroz Y, Parra G, Bonet L, Rodriguez-Iturbe B. Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Am.J.Physiol. Renal Physiol*, 2000, 279: f910-F918

Pagan C, Delorme R, Callebort J, Goubran-Botros H, Amsellem F, Drouot X, Boudebessé C, Le Dudal K, Ngo-Nguyen N, Laouamri H, Gillberg C, Leboyer M, Bourgeron T, Launay JM. The serotonin-N-acetylserotonin-melatonin pathway as biomarker for autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry*. 2014, 4, e479

Pagan C, Goubran-Botros H, Delorme R, Benabou M, Lemièrre N, Murray K, Amsellem F, Callebort J, Chaste P, Jamain S, Fauchereau F, Huguet G, Maronde E, Leboyer M, Launay JM, Bourgeron T. Disruption of melatonin synthesis is associated with impaired 14-3-3 and miR-451 levels in patients with autism spectrum disorders. *Sci Rep*. 2017, 7, 2096

Pereira PM, Marques JP, Soares AR, Carreto L, Santos. MicroRNA expression variability in human cervical tissues. *MAPLoS One*. 2010 Jul 26; 5(7):e11780.

Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004 Nov 11; 432(7014):226-30.

Rabia Zeeshan, Zeeshan Mutahir. Cancer metastasis-tricks of the trade. *Bosn J Basic Med Sci*. 2017 Aug; 17(3):172-182.

Ramadan TA, Taha TA, Samak MA, Hassan A. Effectiveness of exposure to longday followed by melatonin treatment on semen characteristics of Damascus male goat during breeding and non-breeding seasons. *Theriogenology*. 2009, 71, 458-468

- Reiter RJ, et al: Melatonin: Reproductive effects. *J Neur Trans* 13 (Suppl): 209-223, 1978
- Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Manchester LC, Tan DX. Peripheral reproductive organ health and melatonin: ready for prime time. *Int J Mol Sci.* 2013, 14, 7231-7272
- Reiter RJ, Rosales-Corral SA, Tan DX, Acuna-Castroviejo D, Qin L, Yang SF, Xu K. Melatonin, a Full Service Anti-Cancer Agent: Inhibition of Initiation, Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci.* 2017, 18, 843
- Reiter RJ, Tan DX, Paredes SD, Fuentes-Broto L. Beneficial effects of melatonin in cardiovascular disease. *Ann Med.* 2010, 42, 276-285
- Reyes-Prieto, B & Velázquez-Paniagua, Mireya & Prieto-Gomez, Bertha. (2019). Melatonina y neuropatologías.
- Ribatti D. History of research on tumor angiogenesis. Springer. 2008. 3:37
- Rusanova I, Diaz-Casado ME, Fernández-Ortiz M, Aranda-Martínez P, Guerra-Librero A, García-García FJ, Escames G, Mañas L, Acuña-Castroviejo D. Analysis of Plasma MicroRNAs as Predictors and Biomarkers of Aging and Frailty in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* Jul 2018, 2018:7671850
- Sadeh A. Sleep and melatonin in infants: a preliminary study. *Sleep.* 1997;20(3):185–191
- Sainz RM, Mayo JC, Reiter RJ, Antolin I, Esteban MM, Rodriguez C. Melatonin regulates glucocorticoid receptor: an answer to its antiapoptotic action in thymus. *FASEB J.* 1999, 13: 1547-1556
- Sánchez-Barceló EJ, Cos S, Mediavilla D, Martínez-Campa C, González A, Alonso-González C. Melatonin-estrogen interactions in breast cancer. *Journal of pineal research.* 2005, 38(4): 217-222
- Sandri M, Carraro U *Int J Apoptosis of skeletal muscles during development and disease. Biochem Cell Biol.* 1999 Dec; 31(12):1373-90.
- Sempere LF, Christensen M, Silahatoglu A, Bak M, Heath CV, Schwartz G, Wells W, Kauppinen S, Cole CN. 2007. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Research.* 67(24): 11612-11620.
- Shimakami T, Yamane D, Welsch C, Hensley L, Jangra RK, Lemon SMJ Base pairing between hepatitis C virus RNA and microRNA 122 3' of its seed sequence is essential for genome stabilization and production of infectious virus. *Virology.* 2012 Jul; 86(13):7372-83.
- Soares RJ, Cagnin S, Chemello F, Silvestrin M, Musaro A, De Pitta C, Lanfranchi G, Sandri M. J Involvement of microRNAs in the regulation of muscle wasting during catabolic conditions. *Biol Chem.* 2014 Aug 8; 289(32):21909-25.
- Su SC, Hsieh MJ, Yang WE, Chung WH, Reiter RJ, Yang SF. Cancer metastasis: Mechanisms of inhibition by melatonin. *J Pineal Res.* 2017, 62, e12370
- Tordjman S, Chokron S, Delorme R, Charrier A, Bellissant E, Jaafari N, Fougere C: Melatonin: Pharmacology, functions and therapeutic benefits. *Curr Neuropharmacol* 15(3) 434-443. 2017

TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing.

Van Rooij E, Sutherland LB, Qi X, Richardson JA, Hill J, Olson EN. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science*. 2007 Apr 27; 316(5824):575-9.

Villela D, Atherino VF, Lima LS, Moutinho AA, do Amaral FG, Peres R, Martins de Lima T, Torrao Ada S, Cipolla-Neto J, Scavone C, Afeche SC. Modulation of pineal melatonin synthesis by glutamate involves paracrine interactions between pinealocytes and astrocytes through NF- κ B activation. *BioMed Res Int* 2013; 618432: 14

Wang R, Zhou S, Wu P, Li M, Ding X, Sun L, Xu X, Zhou X, Zhou L, Cao C, Fei G. Identifying Involvement of H19-miR-675-3p-IGF1R and H19-miR-200a-PDCD4 in Treating Pulmonary Hypertension with Melatonin. *Mol Ther Nucleic Acids*. Dec 2018, 7;13:44-54

Wang TH, Hsueh C, Chen CC, Li WS, Yeh CT, Lian JH, Chang JL, Chen CY. Melatonin Inhibits the Progression of Hepatocellular Carcinoma through MicroRNA Let7i-3p Mediated RAF1 Reduction. *Int J Mol Sci*. Sep 2018, 10;19(9). Pii:E2687

Weintraub WS. Is atherosclerotic vascular disease related to a high-fat diet?. *J Clin Epidemiol*. 2002, 55, 1064-1072 discussion 1073-1074

Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*. 1993;75:855-862. [PubMed] [Google Scholar]

Wong P, Hui A, Su J, Yue S, Haibe-Kains B, Gokgoz N, Xu W, Bruce J, Williams J, Catton C, Wunder JS, Andrulis IL, Gladdy R, Dickson B, O'Sullivan B, Liu FF. Prognostic microRNAs modulate the RHO adhesion pathway: A potential therapeutic target in undifferentiated pleomorphic sarcomas. *Oncotarget*. 2015 Nov 17; 6(36):39127-39.

Wu N, Meng F, Zhou T, Han Y, Kennedy L, Venter J, Francis H, DeMorrow S, Onori P, Invernizzi P, Bernuzzi Fm Mancinelli R, Gaudio E, Franchitto A, Glaser S, Alpini G. Prolonged darkness reduces liver fibrosis in a mouse model of primary sclerosing colangitis by miR-200b down-regulation. *FASEB J*. 2017,31, 4305-4324

Wu X, Ji H, Wang Y, Gu C, Gu W, Hu L, Zhu L. Melatonin Alleviates Radiation-Induced Lung Injury via Regulation of miR-30e/NLRP3 Axis. *Oxid Med Cell Longev*. Jan 2019: 4087298

Wurtman RJ, Axelrod J, Chu EW: Melatonin, a pineal substance: Effect on the rat ovary. *Science* 141:277-278, 1963

Wurtman RJ, Axelrod J, Kelly DE: The Pineal, New York Academic Press, 1968

Yang Y, Sun B, Huang J, Xu L, Pan K, Fang C, Li M, Li G, Tao Y, Yang X, Wu Y, Miao P, Wang Y, LiH, Ren J, Zhan M, Fang Y, Feng X, Ding X. Up-regulation of miR-325-3p suppresses pineal aralkylamine N-acetyltransferase (Aanat) after neonatal hypoxia-ischemia brain injury in rats. *Brain Res*. 2017. 1668, 28-35.-

Zhang JJ, Meng X, Zhou Y, Xu DP, Li S, Li HB. Effects of melatonin on liver injuries and diseases. *Int J Mol Sci*. 2017, 18, E673

Zhao Y, Zhao R, Wu J, Wang Q, Pang K, Shi Q, Gao Q, Hu Y, Dong X, Zhang J, Sun J. Melatonin protects against A β -induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway. *Biofactors*. Nov 2018, 44(6):609-618

Zhu C, Huang Q, Zhu H. Melatonin Inhibits the Proliferation of Gastric Cancer Cells Through Regulating the miR-16-5p-Smad3 Pathway. *DNA Cell Biol*. Mar 2018, 37(3): 244-252

Zhu HQ, li Q, Dong LY, Zhou Q, Wang H, Wang Y. MicroRNA-29b promotes high-fat diet-stimulated endothelial permeability and apoptosis in apoE knock-out mice by down-regulating MT1 expression. *Int J Cardiol*. 2014, 176, 764-770